

Inhoudstabel

Voorwoord	I
Afkortingen	II
Figuren en grafieken	III
Samenvatting	IV
 Inleiding	 1
1. Opbouw van het centrale zenuwstelsel	1
1.1 Oligodendrocyten	2
1.2 Astrocyten, microglia en ependymcellen	4
2. Multiple Sclerose	5
2.1 Immunopathogenese	5
2.2 Histopathologisch beeld	6
2.3 Oligodendrocytsterfte bij MS	7
3. Transforming Growth Factor-β1	9
3.1 TGF- β 1, regulator van celgroei en apoptose	9
3.2 TGF- β 1 als immunosuppressor	10
3.3 De rol van TGF- β 1 in astrogliose	10
4. Onderzoeksdoel	11
 Materialen en methoden	 12
1. Celweek	12
1.1 Isolatie van O-2A progenitors uit ruggemerg	12
1.2 OLN-93	13
2. Immunocytochemische kleuringen	14
2.1 Immunocytochemische techniek	14
2.2 Protocol immunocytochemische kleuring	14
2.3 Primaire antilichamen	15

3. FACS analyse	16
3.1 Principe	16
3.2 Calceïne-AM / PI	17
4. Transmissie Elektronenmicroscopie	18
5. TUNEL	19
 Resultaten	 20
1. OLGn uit een primaire gliale cultuur	20
1.1 Het effect van TGF- β 1 op O-2A progenitors	20
1.1.1 Immunocytochemische kleuring	20
1.1.2 TUNEL assay	21
1.2 Het effect van TGF- β 1 op mature OLGn	22
2. OLN-93 cellen	23
2.1 Morfologische karakterisatie	23
2.1.1 Immunocytochemische karakterisatie	23
2.1.2 Ultrastructurele karakterisatie	30
2.2 Het effect van TGF- β 1 op OLN-93 cellen	31
2.2.1 Fase contrast microscopie	31
2.2.2 Detectie van apoptose met behulp van FACS	32
2.2.3 TUNEL assay	36
2.2.4 Immunocytochemische kleuring	37
2.2.5 TEM	40
 Discussie	 42
 Referenties	 48
 Appendix	 50

Voorwoord

Het volgen van de opleiding Biomedische wetenschappen was een logische keuze door mijn sterke interesse in de wetenschap en het menselijke lichaam in het bijzonder. Mijn opleiding verliep met de nodige ups en downs, maar door de vele onopgeloste vragen in het biomedisch onderzoek bleef ik gefascineerd tot het einde. Het schrijven van deze thesis sluit dan ook een zeer leerrijke periode af waarin ik kennis maakte met alle facetten van het fundamenteel wetenschappelijk onderzoek.

Bij deze gelegenheid wil ik de fantastische groep mensen bedanken zonder wiens hulp deze thesis nooit tot stand was kunnen komen.

In de eerste plaats wil ik mijn begeleidster, Marjan Moreels, bedanken voor de fijne samenwerking tijdens de afgelopen 6 maanden. Praktische hulp, deskundig advies, kritische verbeteringen en de nodige aanmoedigingen, niets was haar te veel. Daarnaast wil ik ook mijn promotor Dr. Frank Vandenabeele bedanken voor de suggesties en tips ter verbetering van deze thesis. Ook mijn tweede beoordelaar Prof. Dr. Jean-Michel Rigo mag hierbij niet ontbreken, voor zijn beoordeling van mijn eindwerk.

Het begrijpen en gebruiken van de FACS was in het begin geen gemakkelijke klus. Al mijn vragen en frustraties werden met plezier opgelost door Szylvia Baron, Dr. Ilse Smets, Dr. Niels Hellings en Inge Smolders, waarvoor dank.

Daarnaast ook een dankwoordje aan Sara Terryn, omdat ze even de tijd nam voor de statistische verwerking van mijn resultaten.

Verder wil ik iedereen bedanken die mij de afgelopen 6 maanden advies gegeven hebben of mijn prangende vragen wilden beantwoorden. Hiervoor een woordje van dank aan Prof. Dr. Ivo Lambrechts, Dr. Martin Van de Ven, Ellen Gielen, Roeland Buckinx, en last but not least Daniël Janssen voor zijn veterinair advies.

Mijn experimenten zouden vaak mislukt zijn zonder de hulp van de vaste labomedewerkers: Marc Jans, Marie-Josée Sleypen, Nestor Froidmont, Rosette Beenaerts en Wilfried Leyssens die instond voor de verzorging van de ratjes. Deze mensen verdienen daarom zeker ook een dankwoordje.

Verder zou ik mijn medestudenten: Wendy, Annkatrien, Veerle, Ellen, Sofie, Chris en Tony willen bedanken voor de gezellige tijd in het labo en daarbuiten.

Dit alles was echter onmogelijk zonder de onvoorwaardelijke steun van mijn ouders en vriend. Mijn ouders ben ik heel erg dankbaar voor alles wat ze tot nu toe voor mij gedaan hebben en zeker dat ze mij de kans gegeven hebben om te studeren aan het LUC. Ook mijn vriend Saki mag in dit dankwoord niet ontbreken. Hij is reeds 5 jaar mijn steun en toeverlaat en stond altijd klaar als ik het even niet meer zag zitten.

Tot slot ook nog een klein dankwoordje aan Johnneke, die in tijden van stress, een bron van afleiding en ontspanning vormde.

Na deze mooie periode aan het LUC hoop ik dat de toekomst even veelbelovend zal worden...

Ellen Devos

Afkorting

AM	Acetoxymethylester	O-2A	Oligodendrocyt – type 2 astrocyt
APC	Antigenpresenterende Cellen	OLG	Oligodendrocyt
Ara C	Cytosine Arabinoside	OLGn	Oligodendrocyten
BB	Binding Buffer	PBS	Phosphate Buffered Saline
BMP's	Bone Morphogenic Proteins	PI	Propidium Iodide
CDM	Chemically Defined Medium	PLL	Poly-L-Lysine
CNPase	2'3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase	PLP	Proteolipid Protein
CZS	Centrale Zenuwstelsel	PPMS	Primaire Progressieve Multiple Sclerose
DAB	Diaminobenzidine	PRMS	Progressieve-Relapsing Multiple Sclerose
Div	dividen in vitro		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	P/S	Penicilline/Streptomycine
dUTP	deoxy Uridine Trifosfaat	PZS	Perifere Zenuwstelsel
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter	RER	Ruw Endoplasmatisch Reticulum
FCS	Fetal Calf Serum	Rpm	Rotaties per minuut
FSC	Forward Scatter	RRMS	Relapsing-Remitting Multiple Sclerose
GalC	Galactocerebroside	SPMS	Secundaire Progressieve Multiple Sclerose
GDNF	Glia Derived Neurotrophic Factor		
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein	SSC	Side Scatter
HBSS-GPS	Hanks' Balanced Salt Solution - Glucose, Penicilline, Streptomycine	TdT	Terminale deoxynucleotidyl Transferase
HE	Hematoxyline Eosine	TEM	Transmissie Elektronenmicroscopie
IFN- γ	Interferon- γ	TGF- β 1	Transforming Growth Factor- β 1
IL-2	Interleukine-2	Th1	T helper 1
MAG	Myelin Associated Glycoprotein	TNF- α	Tumor Necrose Factor- α
MBP	Myelin Basic Protein	TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling
MOG	Myelin Oligodendroglia Glycoprotein		
MS	Multiple Sclerose	TX	Triton-X100
NGS	Normal Goat Serum		
NK	Natural Killer		
NM	Normalized Medium		

Figuren en grafieken

Figuren:

p.

Figuur 1. Een overzicht van de morfologische verschillen tussen neuronen en de verschillende soorten neuroglia.	1
Figuur 2. Schematische weergave van de verschillende OLG groeistadia.	2
Figuur 3. Overzicht van de verschillende soorten celdood: necrose en apoptose	8
Figuur 4. TGF- β receptors en signaal-transductie.	9
Figuur 5. Voorstelling van de immunocytochemische kleuring volgens het principe van de indirecte techniek.	14
Figuur 6. Werking van de FACS.	16
Figuur 7. Immunocytochemische kleuring van een primaire cultuur na 6 div.	20
Figuur 8. TUNEL assay op een primaire gliale cultuur na 6 div.	21
Figuur 9. Immunocytochemische kleuring van een primaire cultuur na 9 div.	22
Figuur 10. Immunocytochemische kleuring van OLN-93 cellen na 1 div.	24
Figuur 11. Immunocytochemische kleuring van OLN-93 cellen na 3 div.	25
Figuur 12. Immunocytochemische kleuring van OLN-93 cellen na 5 div.	26
Figuur 13. Extra immunocytochemische kleuring van OLN-93 cellen na 5 div.	27
Figuur 14. Immunocytochemische kleuring van OLN-93 cellen na 5 div met of zonder Toediening van TX.	28
Figuur 15. HE kleuring van OLN-93 cellen na 6 div.	28
Figuur 16. Immunocytochemische kleuring van OLN-93 cellen van 6 div na 24u incubatie in medium met 0,5% FCS.	29
Figuur 17. TEM beelden van OLN-93 cellen van 5 div (10% FCS).	30
Figuur 18. Fase contrast beelden.	32
Figuur 19. Output FACS experiment op controlecellen in 10% FCS.	33
Figuur 20. FSC/SSC Scatter plots, Dot plots en Calceïne pieken van FACS analyses in 10% FCS.	35
Figuur 21. TUNEL assay op OLN-93 cellen van 6 div in 10% FCS.	36
Figuur 22. HE kleuring van OLN-93 cellen van 6 div in 10% FCS.	37
Figuur 23. Immunocytochemische kleuringen van controle en 24u behandelde OLN-93 cellen van 6 div in 10% FCS.	38
Figuur 24. Immunocytochemische kleuringen van controle en 24u behandelde OLN-93 cellen van 6 div in 0,5% FCS.	39
Figuur 25. TEM beelden van OLN-93 cellen na 6 div (10% FCS).	40
Figuur 26. Detail TEM beelden van behandelde OLN-93 cellen.	41

Grafieken:

Grafiek 1. Het percentage levende, apoptotische en necrotische OLN-93 cellen bij controle FACS experimenten.	33
Grafiek 2. Het percentage apoptose bij OLN-93 cellen van 6div, zowel controle als na 24u behandeling met 10ng/ml, 50ng/ml en 100ng/ml TGF- β 1.	34
Grafiek 3. Het percentage apoptose bij OLN-93 cellen van 7div, zowel controle als na 48u behandeling met 10ng/ml en 50ng/ml TGF- β 1.	35

Samenvatting

Oligodendrocyten (OLGn) zijn de myelineproducerende cellen van het centrale zenuwstelsel (CZS) en vormen samen met het myeline een belangrijk doelwit in de pathogenese van Multiple Sclerose (MS). Deze demyeliniserende aandoening wordt gekenmerkt door inflammatie, demyelinisatie, astrogliose en verlies van axonen. Cytokines, zoals Transforming Growth Factor β_1 (TGF- β_1), spelen hierbij een belangrijke rol. TGF- β_1 is een pleiotroof cytokine dat in het CZS in verhoogde concentraties aanwezig is bij inflammatie en een belangrijke rol speelt bij de vorming van astrogliose. Daarnaast is het betrokken bij de regulatie van celgroei en -differentiatie, apoptose en immunosuppressie. Recente studies hebben aangetoond dat TGF- β_1 , *in vitro*, een verhoogd percentage apoptose veroorzaakt in O-2A progenitors, maar niet in mature OLGn.

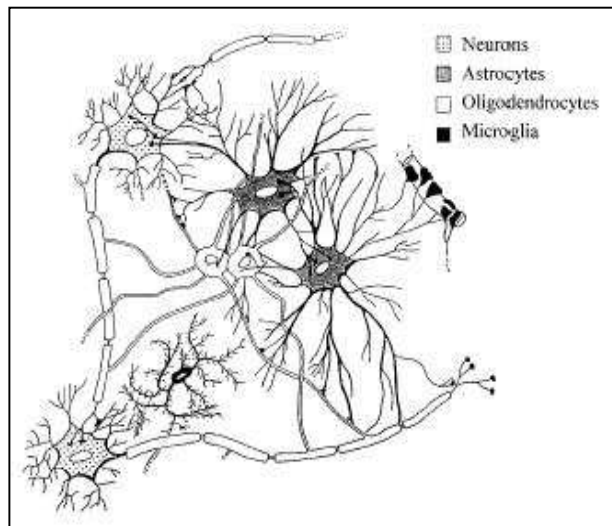
Het doel van deze studie was om de effecten van TGF- β_1 op O-2A progenitors en mature OLGn verder te onderzoeken. De O-2A progenitors werden geïsoleerd uit primaire gliale culturen van neonatale ratjes. Het effect van TGF- β_1 op deze cellen werd met behulp van immunocytochemie en TUNEL assay aangetoond. Verder werd er in dit onderzoek gezocht naar een model voor mature OLGn. Er werd gekozen voor de cellijn OLN-93 die door Richter-Landsberg et al (39) beschreven wordt als een cellijn die antigene eigenschappen van mature OLGn tot expressie brengt. Voor de bepaling van het optimale mature stadium van de OLN-93 cellen, diende er eerst een morfologische karakterisatie uitgevoerd te worden, met behulp van immunocytochemie en transmissie elektronenmicroscopie (TEM). De effecten van TGF- β_1 op OLN-93 cellen werden bestudeerd door middel van fase contrast microscopie, flow cytometrie (FACS), TUNEL assay, immunocytochemie en TEM.

Uit ons onderzoek bleek dat TGF- β_1 een verhoogde hoeveelheid apoptose veroorzaakte bij O-2A progenitors en morfologische veranderingen induceerde bij differentiërende O-2A progenitors en mature OLGn uit een primaire cultuur. Deze uitten zich voornamelijk in het verdwijnen en misvormen van de uitlopers. De differentiatie zelf werd niet belemmerd, in die zin dat de expressie van mature markers aanwezig blijft. Om deze morfologische veranderingen verder uit te diepen werd er gebruik gemaakt van de cellijn OLN-93. Na een morfologische karakterisatie werd het stadium waarin de OLN-93 cellen zich na 5 div bevinden, als meest matuur en ideaal bevonden voor het vervolg van het onderzoek. De immunoreactiviteit voor A2B5, CNPase, MBP en MAG wijzen erop dat OLN-93 cellen zich reeds in een matuur stadium bevinden, maar nog lang niet volledig gedifferentieerd zijn. Waarschijnlijk bevinden ze zich tussen het immature en mature stadium. Na behandeling met TGF- β_1 vertoonden de OLN-93 cellen eveneens morfologische veranderingen. De cellen werden vlakker en kregen een uitgespreid cytoplasma waardoor de uitlopers leken te verdwijnen of misvormen. Het verlies en de misvorming van de uitlopers kunnen een negatieve rol spelen bij de remyelinisatie in MS. Daarnaast dragen de verhoogde apoptose bij O-2A progenitors en de rol in astrogliose bij tot het besluiten dat TGF- β_1 mogelijk een belangrijke rol speelt bij het falen van de remyelinisatie in MS.

Inleiding

1. Opbouw van het centrale zenuwstelsel

Het zenuwstelsel verzorgt de communicatie tussen verschillende gebieden in het lichaam en maakt hiervoor gebruik van zenuwcellen of neuronen. Het zenuwstelsel bestaat uit een perifeer en een centraal gedeelte. Het perifere zenuwstelsel (PZS) staat in voor het opvangen en vervoeren van prikkels, van en naar het ruggemerg en de hersenen. Het bestaat uit craniale en spinale zenuwen, ganglia en sensorische receptoren. Het centrale zenuwstelsel (CZS) is een controlepost die de activiteiten van het PZS, de spieren en orgaansystemen coördineert. Het ontvangt en interpreteert sensorische informatie waarna het aan spieren, organen en weefsels opdracht kan geven tot motorische responsen. Verder is het ook de bron van gedachten, emoties en herinneringen (1,2). Het CZS omvat de hersenen, de hersenstam en het ruggemerg, die bestaan uit neuronen en een aantal gespecialiseerde steuncellen, ook wel neuroglia genoemd. Neuronen zijn opgebouwd uit een cellichaam, een lange uitloper (axon) en kortere uitlopers (dendrieten) (3). Vermits neuronaal



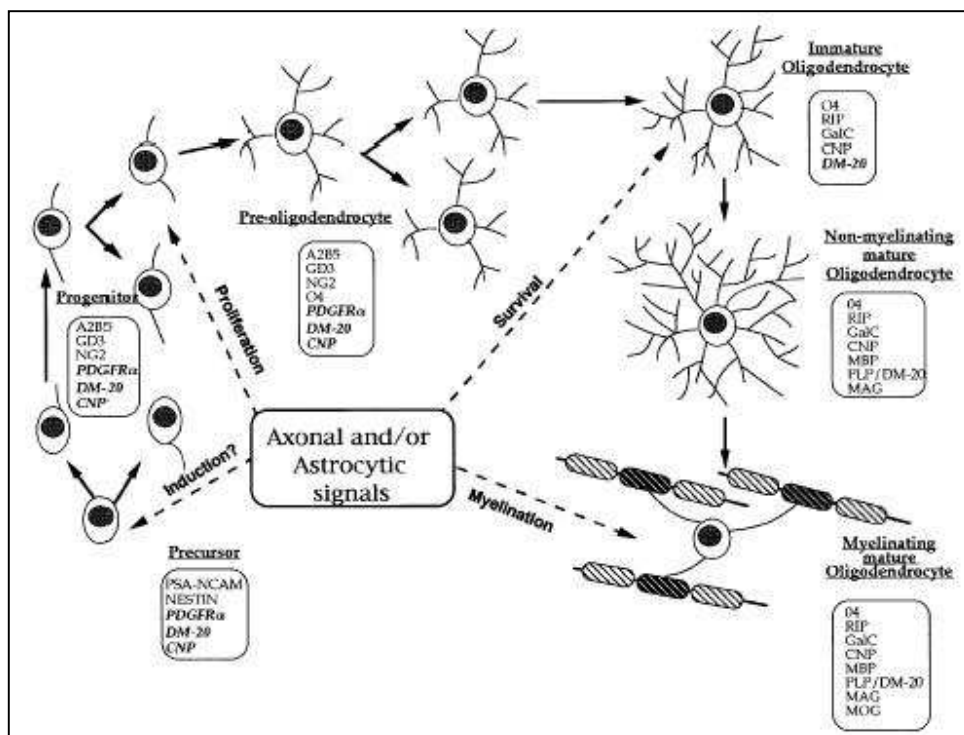
Figuur 1. Een overzicht van de morfologische verschillen tussen neuronen en de verschillende soorten neuroglia.

weefsel geen extracellulaire matrix bevat, creëren de neuroglia een geschikte omgeving voor neuronale activiteit (4). Deze neuroglia omvatten oligodendrocyten (OLGn), astrocyten, microglia en ependymcellen (Figuur 1) (3).

1.1 Oligodendrocyten

OLGn zijn de myelineproducerende cellen van het CZS. Deze cellen hebben een groot aantal uitlopers die tot 50 nabijgelegen axonen kunnen myeliniseren. Myeline vormt een isolatielaag rond de axonen en verhoogt hierdoor de geleidingssnelheid van de elektrische prikkel doorheen de neuronen (3). Deze isolatielaag is opgebouwd uit verschillende concentrische lagen en bestaat voor ongeveer 70 % uit lipiden en voor 30 % uit proteïnen. Het lipidengedeelte bestaat voornamelijk uit cholesterol, fosfolipiden en glycosfingolipiden, zoals galactocerebroside (GalC), de meest typische myelinelipide. Daarnaast bevat myeline ook proteïnen, waarvan het Myelin Basic Protein (MBP) en het Proteolipid Protein (PLP) de belangrijkste zijn. Het zijn beide membraaneiwitten die zorgen voor het compact maken van het myeline. MBP verbindt de intracellulaire zijden van het myeline en PLP de extracellulaire zijden (5).

Zowel *in vivo* als *in vitro* wordt de oligodendrocyt (OLG) ontwikkeling gekenmerkt door fenotypisch gedefinieerde groeistadia (Figuur 2). Per groeistadium worden er specifieke eiwitten of lipiden tot expressie gebracht (6).



Figuur 2. Schematische weergave van de verschillende OLG groeistadia. In de kaders bevinden zich de stadiumafhankelijke markkers.

De OLG ontwikkeling begint reeds tijdens de embryogenese en gaat gepaard met de migratie, proliferatie en differentiatie van OLG precursoren (7). Deze ontstaan in specifieke regio's van het ventriculaire gebied in de hersenen en het ruggemerg (8). Voordat de precursoren beginnen te differentiëren migreren ze eerst doorheen de witte en grijze stof van de hersenen en het ruggemerg (9). In een volgend stadium ontwikkelen de precursoren zich tot bipolaire progenitorcellen, ook wel *oligodendrocyt – type 2 astrocyt (O-2A) progenitors* genoemd. *In vitro* kunnen deze cellen, in afwezigheid van serum, zich verder ontwikkelen tot OLGn en in aanwezigheid van serum tot type-2 astrocyten. De sterke proliferatiecapaciteit en de hoge beweeglijkheid zijn typerende kenmerken van O-2A progenitors (7). Immunocytochemisch worden ze gekenmerkt door de aanwezigheid van een oppervlakte ganglioside dat herkend wordt door het antilichaam A2B5 (10). In een volgend stadium krijgen de O-2A progenitors meerdere uitlopers, worden de cellen minder beweeglijk en brengen ze op immunocytochemisch niveau sulfatiden en glycolipiden tot expressie die herkend worden door het antilichaam O4 (5,6,7). Niet alle progenitorcellen differentiëren tijdens de ontwikkeling, waardoor het volwassen CZS over een beperkte pool “volwassen” progenitorcellen blijft beschikken (11). Wanneer de cellen GalC en 2'3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (CNPase), het vroegste myelinegeassocieerde eiwit, tot expressie brengen bevinden ze zich in het *immature OLG* stadium. Beide merkers blijven gedurende het volledige verdere maturatieproces aanwezig. De expressie van GalC kondigt de terminale OLG differentiatie aan en daarmee ook het verlies van proliferatie- en migratiemogelijkheden (7). *Mature OLGn*, die nog geen myeline produceren, brengen de eiwitten MBP, PLP en Myelin Associated Glycoprotein (MAG), een immunoglobulineachtig integraal membraanglycoproteïne, tot expressie. Mature post-mitotische myelineproducerende OLGn met complexe uitlopers brengen nog een extra oppervlakte eiwit, Myelin Oligodendroglia Glycoprotein (MOG) tot expressie (5).

Op ultrastructureel niveau vertonen OLGn een duidelijke ronde kern met donker gekleurd heterochromatine en licht gekleurd euchromatine. In het cytoplasma is een uitgebreid ruw endoplasmatisch reticulum (RER), talrijke mitochondriën en een groot Golgi apparaat aanwezig. Er zijn geen intermediaire filamenten terug te vinden, maar de vele uitlopers bevatten wel een groot aantal microtubuli (3,12)

1.2 Astrocyten, microglia en ependymcellen

Astrocyten zijn stervormige cellen met vele uitlopers die een specifiek soort intermediair filament bevatten, namelijk het Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). Astrocyten staan voornamelijk in voor de vorming van de bloedhersenbarrière en zorgen voor de structurele ondersteuning van de neuronen en de neuroglia. Daarnaast zijn astrocyten ook betrokken bij de migratie van ontwikkelende neuronen tijdens de embryogenese en bij het transporteren van vloeistoffen en ionen vanuit de extracellulaire ruimte rond de neuronen naar de bloedvaten (3). Bij schade aan het CZS prolifereren astrocyten zodanig dat er littekenweefsel ontstaat. Dit proces wordt astrogliose genoemd (7).

Microglia zijn gespecialiseerde macrofagen van het CZS. Het gehele CZS is doordrongen met een omvangrijk netwerk van residente microgliacellen. Bij ziekte worden ze geactiveerd en neemt hun aantal en grootte aanzienlijk toe (3). Na activatie functioneren ze als antigeenpresenterende cellen, secreteren verschillende immunoregulatorische cytokines en recruterende macrofagen uit de periferie (4).

Ependymcellen zijn van epitheliale oorsprong, rusten niet op een basaal membraan en bevatten cilia en microvilli. Ze bekleden de met cerebrospinaal vocht gevulde ventriculaire holten van de hersenen en het centrale kanaal van het ruggemerg (3).

2. Multiple Sclerose

Multiple Sclerose (MS) is de meest voorkomende demyeliniserende aandoening van het CZS (1). Het is een chronische ontstekingsziekte die gekenmerkt wordt door inflammatie, demyelinisatie, astrogliose, OLG celdood en destructie en verlies van axonen (13,14). Bij MS wordt de opeenstapeling van problemen enerzijds veroorzaakt door de aantasting van het myeline en anderzijds door het onvermogen tot herstel (7).

De myelinedestructie bij MS resulteert in ernstige functionele afwijkingen zoals verlamming, verlies van prikkelgevoeligheid, zicht en coördinatie. De aard van de afwijkingen hangt af van het aangetaste gebied in het CZS (3). Er zijn 4 verschillende klinische types van MS te onderscheiden. Een eerste type is relapsing-remitting MS (RRMS) waarbij de patiënt een reeks acute opstoten (relapses) van neurologische defecten doormaakt, gevolgd door een periode van gedeeltelijk of volledig herstel (remission). Dit type kan evolueren tot secundaire progressieve MS (SPMS) waarbij er ongeacht het verminderd aantal acute opstoten, toch een achteruitgang is van het neurologisch functioneren. Het derde type, primaire progressieve MS (PPMS) gaat gepaard met een sterke achteruitgang van neurologische functies zonder het ontstaan van acute opstoten. In een laatste type, progressieve-relapsing MS (PRMS) heeft de ziekte eenzelfde verloop als bij PPMS, maar wordt aangevuld met sporadische opstoten (14).

2.1 Immunopathogenese

Er wordt aangenomen dat MS een autoimmune aandoening is, die voorkomt in genetisch vatbare personen na blootstelling aan tot nu toe onbekende omgevingsfactoren (15). Studies hebben aangetoond dat er zowel in de circulatie van MS-patiënten als bij gezonde personen, autoreactieve T-cellen voorkomen die gericht zijn tegen myeline-eiwitten. Vooraleer deze autoreactieve T-cellen schade kunnen aanrichten, dienen ze eerst geactiveerd te worden. Een mogelijk mechanisme dat hiervoor instaat is moleculaire mimicry. Virussen of bacteriën kunnen eiwitten bevatten waarvan bepaalde sequenties overeenkomen met lichaamseigen eiwitten, zoals myeline-eiwitten. Wanneer deze virale of bacteriële eiwitten in de bloedbaan door antigeenpresenterende cellen (APC) tot expressie worden gebracht, kunnen er autoreactieve CD4⁺ T-cellen geactiveerd worden.

In actieve toestand kunnen deze T-cellen doorheen de bloedhersenbarrière dringen. Aangekomen in het CZS zullen ze myeline-eiwitten, die gepresenteerd worden door lokale APC, aanzien als viraal of bacterieel eiwit en hiertegen een immuunrespons beginnen (13,16). Na activatie differentiëren CD4⁺ T-cellen tot het T helper 1 (Th1) fenotype dat gekenmerkt wordt door de secretie van proinflammatoire cytokines, zoals Tumor Necrose Factor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ) en Interleukine-2 (IL-2) (17). Deze cytokines zorgen voor het ontstaan van een ontstekingsreactie waarbij CD8⁺ T-cellen, B-cellen en macrofagen aangetrokken en geactiveerd worden. Deze secundaire ontstekingscellen zorgen er op hun beurt voor dat het myeline en de OLGn beschadigd worden (15). Microglia zorgen voor de verwijdering van myelinedebris door receptorgemedieerde fagocytose en lysosomale activiteit (4).

2.2 Histopathologisch beeld

Histopathologisch wordt MS gekenmerkt door de aanwezigheid van één of meerdere gedemyeliniseerde plaques in de witte stof van de hersenen en het ruggemerg. De plaques kunnen overal in de witte stof ontstaan maar worden voornamelijk waargenomen in de periventriculaire regio's, de optische zenuwen, de hersenstam, het cerebellum en het ruggemerg. Afhankelijk van het ontwikkelingsstadium, actief of chronisch, vertonen de plaques verschillende hoeveelheden immuuncellen en immunoreactieve substanties.

Actieve plaques zijn zacht roze, slecht afgebakend en hypercellulair. De infiltratie van autoreactieve T-cellen en macrofagen rond venen en venulen zorgt voor het ontstaan van perivasculaire cuffs. Aan de rand van de lesie bevinden zich reactieve astrocyten (1,15). Verder worden actieve plaques gekenmerkt door demyelinisatie en schade aan axonen. De demyelinisatie kan onderverdeeld worden in 4 patronen. Alle patronen vertonen een T-cel- en macrofaaggedomineerde ontstekingsreactie, maar in patroon I en II wordt voornamelijk het myeline aangetast, terwijl in patroon III en IV de OLGn het doelwit zijn. In *patroon I* wordt de demyelinisatie veroorzaakt door de toxines van macrofagen, zoals TNF- α , IFN- γ en reactieve zuurstofverbindingen. In *patroon II* wordt de myelineafbraak gemedieerd door antilichamen en de activatie van de complement cascade. Ondanks de uitgesproken aantasting van het myeline, kan er in de eerste twee patronen remyelinisatie optreden. *Patroon III* wordt gekenmerkt door apoptose van

OLGn en hiermee gepaard het verlies van MAG. *Patroon IV* komt alleen voor in een aantal zeldzame gevallen van PPMS en gaat gepaard met niet-apoptotische degeneratie van OLGn (15,17)

Wanneer de myelineafbraak en ontstekingsreacties uiteindelijk afnemen ontstaat er een chronische plaque. Dit is een scherp afgelijnd, grijs en gedemyeliniseerd gebied waarin weinig of geen OLGn voorkomen. Na de OLG sterfte en fagocytose door macrofagen, wordt het beschadigde gebied opgevuld door reactieve astrocyten, die een astrocytenlitteken of gliose vormen (1,3). Het gebied is hypocellulair, bevat axonschade en er zijn nog weinig perivasculaire T-cellen terug te vinden. Wanneer een chronische plaque toch nog tekenen van ontsteking vertoont is er sprake van een chronisch actieve plaque.

In uitzonderlijke gevallen kunnen er in acute plaques, vooral in patroon I en II, of aan de rand van chronische plaques ook schaduwplaques ontstaan. Dit zijn begrensde gebieden waarin er remyelinisatie is opgetreden (15).

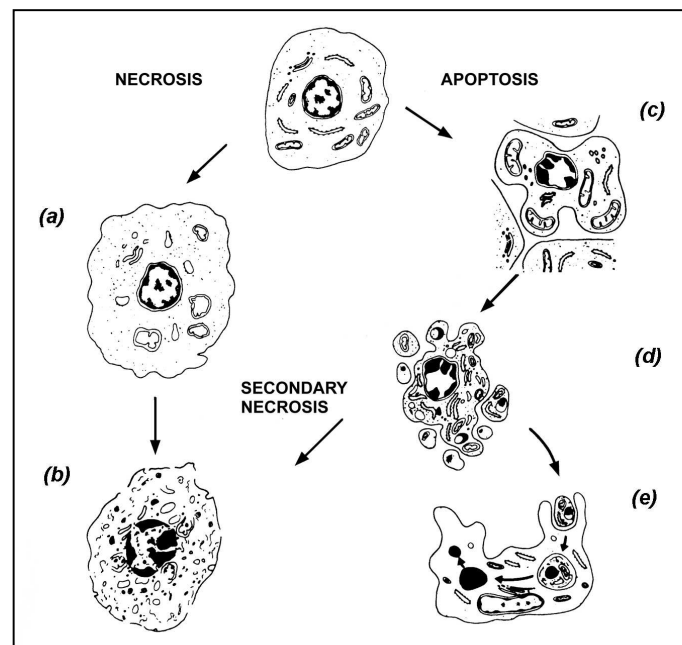
2.3 Oligodendrocytsterfte bij MS

Cellen kunnen op 2 manieren sterven, namelijk door middel van necrose of apoptose (Figuur 3). *Necrose* is het afsterven van cellen of weefsels, meestal veroorzaakt door schade aan de cel, waarbij een ontstekingsreactie ontstaat. De meeste voorkomende oorzaken van necrose zijn ischemie, trauma of een metabole oorzaak. De cellen zwellen op en lyseren uiteindelijk. Het vrijkomen van lytische enzymen veroorzaakt de ontstekingsreactie. De celresten worden uiteindelijk verwijderd door macrofagen (1).

Apoptose of geprogrammeerde celdood, is een energieafhankelijk proces waarbij individuele cellen verwijderd worden. Het speelt een rol in de morfogenese en is het mechanisme dat de orgaangrootte en de celturnover controleert. Ook ongewenste of defecte cellen ondergaan apoptose. Een groot aantal intra- en extracellulaire factoren kunnen apoptose controleren. Dit resulteert in een reeks verschillende stadia met morfologische veranderingen. De eerste veranderingen vinden plaats in de nucleus en uiten zich in de condensatie van chromatine en het ontstaan van uitstulpingen in het nucleaire celmembraan. Vervolgens wordt het chromatine gefragmenteerd door niet-lysosomale endonucleasen en zal ook de nucleus uiteen vallen in verschillende

gefragmenteerde delen (18,19). Ondertussen ontstaat er ook een condensatie van het cytoplasma waardoor de cel begint te krimpen (20). Het celmembraan vertoont uitstulpingen en een gewijzigde asymmetrie, maar de integriteit blijft intact. Uiteindelijk zal de cel uiteenvallen in kleinere membraangebonden fragmenten, apoptotische bodies genoemd, die gefagocyteerd worden door nabijgelegen cellen of macrofagen. Doordat de celmembraan intact blijft ontstaat er geen ontstekingsreactie. *In vitro* is het mogelijk dat de apoptotische bodies toch opzwellen en lyseren en dit fenomeen wordt secundaire necrose genoemd (1).

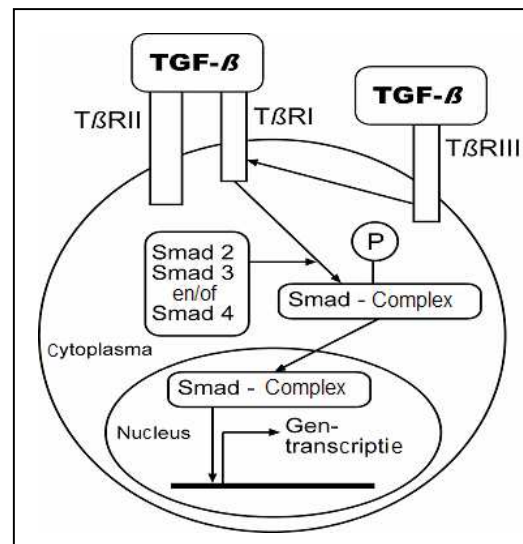
Naast het demyelinisatiepatroon III zijn er geen sluitende bewijzen dat de OLGn tijdens MS sterven door apoptose (21).



Figuur 3: Overzicht van de verschillende soorten celdood: necrose en apoptose. a) de cel zwelt op b) de cel lyseert waardoor er een ontstekingsreactie ontstaat c) de cel krimpt d) vorming van apoptotische bodies e) fagocytose door naburige cellen of macrofagen. In vitro kunnen de apoptotische bodies ook lyseren en dit wordt secundaire necrose genoemd.

3. Transforming Growth Factor- β 1

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) behoort tot de superfamilie van dimere polypeptide groeifactoren waartoe ook activines, Bone Morphogenic Proteins (BMP's) en Glia-derived Neurotrophic Factor (GDNF) behoren (22). In zoogdieren bevat de TGF- β familie 3 isovormen: TGF- β 1, - β 2 en - β 3. Afhankelijk van het celtype en de omgeving spelen deze 3 isovormen een rol bij de controle van celgroei, apoptose en ontstekingsreacties (23). De signaaloverdracht gebeurt via een heterotetrameer complex van 3 transmembranaire serine/threonine kinase receptoren bekend als type I, II en III (Figuur 4) (6). De binding van TGF- β op type II resulteert in de activatie van type I. Deze zal op zijn beurt een aantal Smad eiwitten fosforyleren, die vervolgens interageren met verschillende transcriptiefactoren voor de regulatie van de gentranscriptie. Receptor type III verhoogt de affiniteit van type II voor TGF- β (22,23).



Figuur 4: TGF- β receptors en signaal-transductie.

TGF- β 1 is de isovorm die in het CZS alleen geproduceerd wordt tijdens schade of ontstekingsreactie. In een gezond CZS komt het slechts in zeer lage hoeveelheden of helemaal niet voor (24). Bij MS wordt het geproduceerd door geactiveerde astrocyten, Th3-cellen, macrofagen en microglia (25,26). TGF- β 1 is een pleiotroof en multifunctioneel cytokine dat in het CZS voornamelijk betrokken is bij de regulatie van celgroei en -differentiatie, apoptose, immunosuppressie en wondheling (6,27).

3.1 TGF- β 1, regulator van celgroei en apoptose

TGF- β 1 treedt op als negatieve regulator van celgroei bij verschillende celtypen. Zo inhibeert het de proliferatie van OLG progenitors, maar promoot het wel de differentiatie tot mature OLG (6,28). Recent werd ontdekt dat TGF- β 1 *in vitro* apoptose veroorzaakt

bij OLG progenitors en dat het de maturatie van humane OLGn inhibeert (6,29). Daarnaast reguleert TGF- β 1 de gliale en neuronale survival (27).

3.2 TGF- β 1 als immunosuppressor

Tijdens ontstekingsreacties wordt er TGF- β 1 geproduceerd door geactiveerde immuuncellen, zoals Th3-cellen, macrofagen en microglia (30). TGF- β 1 werkt immunosuppressief door de activatie en proliferatie van de immuuncellen te onderdrukken (22). Meer specifiek inhibeert het de proliferatie van T- en B-cellen, de maturatie van cytotoxische lymfocyten en NK cellen en werkt het de activiteiten van pro-inflammatoire cytokines tegen (26,31). Verder deactiveert het macrofagen door de productie van reactieve zuurstofintermediären te inhiberen en onderdrukt het de functies van geactiveerde microglia (27,32). Bij zeer lage concentraties kan TGF- β 1 als chemoattractant werken, waarbij het immuuncellen zoals monocytën, macrofagen, T-cellen, B-cellen, en natural killer (NK) cellen zal aantrekken. De aangetrokken immuuncellen worden vervolgens door TGF- β 1 gestimuleerd tot de synthese van pro-inflammatoire cytokines.

De rol van TGF- β 1 tijdens ontstekingsreacties kan dus als tweeledig beschouwd worden. Het treedt zowel pro-inflammatoir als immunosuppressief op, maar de rol als immunosuppressor blijft het belangrijkste (30).

3.3 De rol van TGF- β 1 in astrogliose

TGF- β 1 speelt een belangrijke rol bij de littekenvorming in MS plaques door de productie van extracellulaire matrixproteïnen te bevorderen. Astrocyten vormen in het CZS de grootste bron van extracellulaire matrixproteïnen, zoals laminine, fibronectine en proteoglycanen. Wanneer er in MS plaques demyelinisatie en schade aan oligodendrocyten en axonen is opgetreden zal dit onder invloed van TGF- β 1 hersteld worden door de activatie van astrocyten. Hierdoor wordt er een proces in gang gezet dat reactieve astrogliose heet. De astrocyten zullen op de plaats van de schade een litteken vormen waardoor secundaire lesies voorkomen worden, maar door de plaats op te vullen zullen zij voorkomen dat er axonale regeneratie en remyelinisatie plaats vindt (27).

4. Onderzoeksdoel

Recent werd aangetoond dat TGF- β 1 *in vitro* een verhoogd percentage apoptose veroorzaakt in O-2A progenitors, maar niet in mature OLGn (6). In deze studie willen we de effecten van TGF- β 1 op O-2A progenitors en mature OLGn verder onderzoeken.

De O-2A progenitors worden geïsoleerd uit primaire gliale culturen van neonatale ratjes. Het effect van TGF- β 1 op deze cellen wordt aangetoond met behulp van immunocytochemie en TUNEL assay.

Verder wordt er in dit onderzoek gezocht naar een model voor mature OLGn. Er werd gekozen voor de cellijn OLN-93 die door Richter-Landsberg et al (33) beschreven wordt als een cellijn die antigene eigenschappen van mature OLGn tot expressie brengt.

Voor de bepaling van het optimale mature stadium van de OLN-93 cellen dient er eerst een morfologische karakterisatie uitgevoerd te worden met behulp van immunocytochemie en transmissie elektronenmicroscopie (TEM). De effecten van TGF- β 1 op OLN-93 cellen worden bestudeerd door middel van fase contrast microscopie, flowcytometrie (FACS), TUNEL assay, immunocytochemie en TEM.

Materialen en methoden

1. Celkweek

Tijdens dit onderzoek werd zowel gebruik gemaakt van een primaire cultuur van OLGn als van de permanente cellijn OLN-93.

1.1 Isolatie van O-2A progenitors uit ruggemerg

De isolatie van O-2A progenitors uit ruggemerg gebeurde volgens de techniek van Van der Pal (34). Hierbij werd een primaire gemengde gliale cultuur geïsoleerd uit het ruggemerg van neonatale Whistar ratjes van 3 dagen oud. Na de decapitatie werden de rattenlichaampjes ontsmet in 70% ethanol en gewassen met Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (samenstelling zie appendix), waaraan 0,1% glucose (Merck Eurolab, Leuven, België) en 0,1% Penicilline/Streptomycine (P/S, Gibco, Invitrogen, Merelbeke, België) (HBSS-GPS) toegevoegd werden. Het ruggemerg werd vervolgens uit de wervelkolom geïsoleerd en overgebracht naar een DNase-oplossing (Boehringer Mannheim-Roche, Brussel, België). Het geheel werd fijngehakt en gedurende 30 minuten opgelost in trypsine (4 mg/ml HBSS-GSP, Sigma-Aldrich, Bornem, België) bij 37°C. Na toevoeging van HBSS-GPS, werd de celsuspensie tweemaal gecentrifugeerd (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Duitsland) aan 1800 rpm. Alle handelingen werden uitgevoerd bij kamertemperatuur, zoniet wordt het er extra bij vermeld. Het verkregen pellet werd opgelost in trypsine-inhibitor (2mg/ml, Sigma-Aldrich, Bornem, België) en DNase (1 mg/ml HBSS-GSP). Vervolgens werd de celsuspensie gefiltreerd over een 100 µm nylon filtergaas (Prosep, VWR International, Leuven, België) en gedurende 12 minuten gecentrifugeerd aan 1800 rpm. Na de verwijdering van het supernatans werd het pellet opgelost in Normalized Medium (NM) (samenstelling zie appendix) aangevuld met 0,1% P/S en 5% foetaal kalfserum (FCS, Perbio Science, HyClone, Groot-Brittannië). De celsuspensie werd vervolgens gefiltreerd over een 30 µm nylon filtergaas en hierna werden de cellen geteld met behulp van trypaan blauw en een Fuchs-Rosenthal telkamer. Er werden $5,5 \times 10^4$ cellen in een druppel uitgezaaid op glaasjes gecoat met 5 µg/ml

Poly-L-Lysine (PLL, Sigma-Aldrich, Bornem, België). Na een aanhechtingsperiode van 1 uur in een 5% CO₂ incubator (EG 110 IR Jouan, Astel, Chateau Gontier, Frankrijk) bij 37°C werden de losse cellen verwijderd en nieuwe NM toegevoegd. De volgende dag werd het NM vervangen door Chemically Defined Medium (CDM, samenstelling zie appendix) na eerst éénmaal gespoeld te hebben met CDM. Het CDM zorgt voor de differentiatie van de OLGn zodat deze zich na 6 dagen in een matuur stadium bevinden. Nog een dag later werd er Cytosine Arabinoside (Ara-C, 10 µg/ml, Sigma-Aldrich, Bornem, België) aan het CDM toegevoegd, wat ervoor zorgt dat de astrocytengroei geremd wordt. 2 dagen later werd dit medium vervangen door CDM aangevuld met 0,5% FCS en dit werd om de 2 dagen herhaald.

Om het effect van TGF-β1 (Sigma-Aldrich, Bornem, België) te bestuderen werden de neonatale celculturen behandeld met verschillende concentraties TGF-β1. O-2A progenitors werden 1 dag na de isolatie reeds behandeld gedurende 5 dagen. Na 6 dagen zijn de O-2A progenitors volledig gedifferentieerd tot mature OLGn. Om het effect van TGF-β1 op mature OLGn na te gaan, werden ze vanaf dag 6 gedurende 72 uur behandeld.

1.2 OLN-93

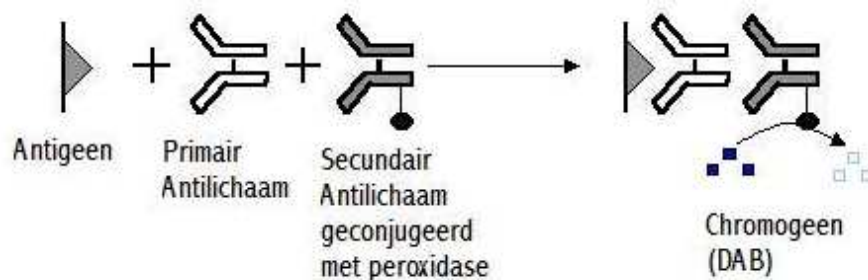
De permanente cellijn OLN-93 is ontstaan uit spontaan getransformeerde cellen in primaire gliaculturen van de rat (33). De gebruikte cellijn is afkomstig van Dr. C. Richter-Landsberg (Universiteit van Oldenburg, Oldenburg, Duitsland) en werd maximaal gebruikt tot en met passage 13. De cellen werden uitgezaaid in niet-gecoate kweekflesjes (25 cm², Nunclon, VWR international, Leuven, België) en 6 wellplaten (Nunclon, VWR International, Leuven, België) gecoat met 5 µg/ml PLL. Als medium werd er Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Invitrogen, Merelbeke, België) met 10% geïnactiveerd FCS (Greiner Bio-One, Wommel, België) en 1% P/S gebruikt. Het geheel werd geïncubeerd in een 10% CO₂ incubator bij 37°C.

Om het effect van TGF-β1 op OLN-93 cellen te bestuderen werden de cellen gedurende 24u en 48u behandeld met 10 ng/ml TGF-β1.

2. Immunocytochemische kleuringen

2.1 Immunocytochemische techniek

Voor de immunocytochemische karakterisatie van de cellen werd er gebruik gemaakt van de indirecte techniek (Envision System kit, Dakocytomation, Glostrup, Denemarken) (Figuur 5). Hierbij wordt een primair monoklonaal antilichaam gebruikt, dat gericht is tegen één specifiek epitoom. Vervolgens wordt er een secundair antilichaam toegevoegd dat gericht is tegen het primaire antilichaam en geconjugeerd is met een peroxidase gelabeld polymeer. Na toevoeging van een chromogeen (DAB) ontstaat er een kleurreactie.



Figuur 5: Voorstelling van de immunocytochemische kleuring volgens het principe van de indirecte techniek.

2.2 Protocol immunocytochemische kleuring

Voor het uitvoeren van immunocytochemische kleuringen werden de cellen uitgezaaid op gecoate glaasjes (12 mm Ø, Menzel, Braunschweig, Duitsland). Voordat de celculturen immunocytochemisch gekleurd konden worden, dienden de cellen eerst gedurende 15 minuten gefixeerd te worden in Unifix (4% formaldehyde, Klinipath, Turnhout, België). Daarna werd er gespoeld met Phosphate Buffered Saline (PBS, 0,01M, pH 7,2). Afhankelijk van het soort antilichaam werden de cellen al of niet 30 minuten gepermeabiliseerd met 0,05% Triton X-100 (TX, Boehringer, Mannheim, Duitsland) bij 4°C. Na enkele malen gespoeld te hebben met PBS werden gedurende 20 minuten de niet-specifieke bindingen geblockt met 3% normaal geitensersum (NGS,

DakoCytomation, Glostrup, Denemarken). Na het blokken werd nogmaals gespoeld met PBS. Vervolgens werden gedurende 1 uur de primaire antilichamen (Zie 2.3) toegevoegd. Na de incubatie werd er opnieuw gespoeld met PBS. In een volgende stap werd het secundaire antilichaam toegevoegd en dit voor 30 minuten. Het secundaire antilichaam was goat-anti-mouse en geconjugeerd met een peroxidase gelabeld polymeer. Na het spoelen met PBS werd gedurende 1 à 10 minuten het chromogeen Diaminobenzidine (DAB) toegevoegd tot er een bruine kleur zichtbaar werd. Er werd opnieuw nagespoeld met gedestilleerd water. Als tegenkleuring werden de celkernen gedurende 3 minuten gekleurd met hematoxyline en eosine. In een volgende stap werd eerst gespoeld met kraantjeswater en daarna met gedestilleerd water. De glaasjes en labteks werden met Aquatex (Merck, Darmstadt, Duitsland) op een dekglasje (76 x 26 mm, Menzel, Braunschweig, Duitsland) gemonteerd en bekeken met behulp van een lichtmicroscop met ingebouwde camera (Nikon Eclipse 80i, Nikon Corporation, Japan).

2.3 Primaire antilichamen

Om aan te tonen in welk differentiatiestadium de cellen zich bevinden werden er primaire antilichamen gebruikt die kenmerkend zijn voor elk specifiek stadium van de OLG (O-2A, immatuur, matuur).

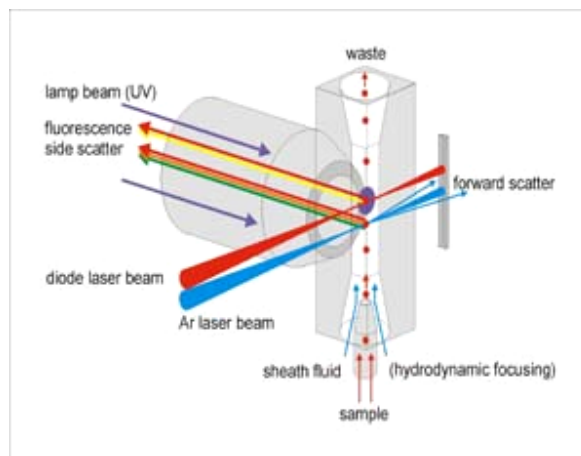
O-2A progenitors werden aangetoond met een antilichaam dat gericht is tegen A2B5 (muis monoklonaal, 1/200, 1/500, Chemicon International, Temecula, Verenigde Staten). Voor het aantonen van immature OLGn werd gebruik gemaakt van een antilichaam gericht tegen GalC (muis monoklonaal, 1/25, 1/50, verkregen door Dr. V.W. Jong Calgary) en CNPase (muis monoklonaal, 1/500, Sigma-Aldrich, Bornem, België).

Mature OLGn werden aangetoond met antilichamen gericht tegen MBP (muis monoklonaal, 1/100, 1/200, Serotec, Oxford, Groot-Brittannië) en MAG (muis monoklonaal, 1/250, 1/500, Chemicon International, Temecula, Verenigde Staten). Om na te gaan in welke mate de OLG cultuur gecontamineerd werd met astrocyten werd een antilichaam gebruikt dat gericht is tegen het Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP, muis monoklonaal, 1/200, Novocastra Laboratories, Newcastle, Engeland), een intermediair filament aanwezig in mature astrocyten.

3. FACS analyse

3.1 Principe

Een Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) werkt volgens het principe van flow cytometrie. Individuele cellen in suspensie worden één voor één langs een laser gevoerd. Als een cel de lichtstraal passeert veroorzaakt dit een verstrooiing van het licht, die in voorwaartse (Forward Scatter, FSC) en in zijwaartse richting (Side Scatter, SSC) gedetecteerd kan worden (Figuur 6). De FSC wordt gecorreleerd met de grootte van de cel;



Figuur 6: Werking van de FACS.

de SSC geeft informatie over de granulariteit van de cel. Daarnaast wordt ook het door fluorochromen uitgezonden licht gedetecteerd. Deze fluorochromen werden op voorhand aan de celsuspensie toegevoegd en kunnen door hun hoge affiniteit voor specifieke eiwitten en lipiden de expressie hiervan in de cellen zichtbaar maken. Dit maakt het mogelijk om celpopulaties van elkaar te onderscheiden (35).

De apoptosemerker die tijdens dit onderzoek gebruikt werd is Calceïne-acetoxymethylester (AM) (Molecular Probes, Leiden, Nederland). Het is een niet-fluorescerende stof die doorheen de celmembraan kan dringen. In levende cellen zal het AM-gedeelte gehydrolyseerd worden door intracellulaire esterases. Hierdoor blijft er een fluorescerende vorm van calceïne over en zullen levende cellen dus fluoresceren (36). Tijdens apoptose vertonen de intracellulaire esterases een verminderde werking waardoor calceïne-AM niet gehydrolyseerd wordt en apoptotische cellen niet zullen fluoresceren. Calceïne-AM negatieve cellen zullen tijdens de FACS analyse als apoptotisch worden beschouwd (37).

Als necrosemerker werd Propidium Iodide (PI, Bender MedSystems, Wenen, Oostenrijk) gebruikt. PI is een fluorochroom met hoge affiniteit voor de nucleïnezuren van het DNA. Gebonden aan het DNA zal de rode fluorescentie van PI 20 tot 30 keer toenemen.

Binding aan het DNA is uitsluitend mogelijk wanneer cellen een beschadigd celmembraan hebben zoals bij necrose of laattijdig in het apoptoseproces, ook wel secundaire necrose genoemd (38).

3.2 Calceïne-AM / PI

Enkel de OLN-93 cellen ondergingen een FACS analyse en hiervoor werden ze uitgezaaid in 6 wellplaten. Het bovenstaande medium, waarin mogelijk dode cellen aanwezig zijn, werd verwijderd en 2 minuten gecentrifugeerd (Eppendorf Centrifuge 5415D, Hamburg, Duitsland) aan 13200 rpm. Vervolgens werden de cellen getrypsiniseerd door toevoeging van 1 ml trypsine per well (0,25%, Invitrogen, Merelbeke, België). Na het loskomen van de cellen werd er 200µl FCS toegevoegd om de trypsine te inactiveren. Nadat de getrypsiniseerde en gecentrifugeerde cellen bij elkaar werden gevoegd, werd de celsuspensie overgebracht naar een 96 wellplaat (Greiner Bio-One, Wemmel, België) en 10 minuten gecentrifugeerd (Eppendorf Centrifuge 5810, Hamburg, Duitsland) aan 1500 rpm. Na het verwijderen van het supernatans werd er 150 µl PBS toegevoegd en zachtjes geresuspendeerd, waarna er opnieuw gecentrifugeerd werd onder dezelfde condities. Na verwijdering van het supernatans werd er aan elke well 100 µl Binding Buffer (BB, samenstelling zie appendix), 2 µl Calceïne-AM oplossing (samenstelling zie appendix) en 5 µl PI toegevoegd. Het geheel werd 10 minuten in het donker geïncubeerd. Na toevoeging van 100 µl PBS werd de celsuspensie overgebracht naar een FACS buis (Costar, Corning Incorporated, Elscolab, Kruibeke, België), gevortexed en werd de meting uitgevoerd met een FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Erembodegem, België). De analyse gebeurde met behulp van de software CellQuest (Becton Dickinson, Erembodegem, België).

Daarnaast werden de resultaten onderworpen aan een niet-parametrische ANOVA-test met behulp van de software Graphpad Instat Demo.

4. Transmissie Elektronenmicroscopie

Om cellen via transmissie elektronenmicroscopie (TEM) te kunnen bekijken dienden ze eerst uitgezaaid te worden op thermanox glaasjes (Thermanox Plastic Coverslips, 13 mm Ø, Nunc, Rochester, Verenigde Staten). Vervolgens werden de cellen gedurende 1u gefixeerd in 2% glutaraaldehyde (Sigma-Aldrich, Bornem, België) bij 4°C. Na een spoeling met natriumcacodylaatbuffer (0,05M, pH 7,3) aangevuld met 0,15M saccharose volgde een 1 uur durende postfixatie in 2% osmiumtetroxide (Sigma-Aldrich, Bornem, België) bij 4°C. Hierna werd er opnieuw gespoeld met natriumcacodylaatbuffer aangevuld met saccharose. Om de cellen te dehydrateren werden ze in stijgende concentraties aceton ondergedompeld om vervolgens overnacht geïmpregneerd te worden in een mengsel van aceton en araldit. Uiteindelijk werden de cellen ingebed in 100% araldit met behulp van een gietvorm (pop-off methode). Na een polymerisatieperiode van 24u tot 36u bij 60°C werden de verharde harsstaafjes met uitgezaaide cellen met behulp van vloeibare stikstof van de thermanoxglaasjes gescheiden. In een volgende stap werden er van de harsstaafjes ultradunne coupes (50 nm) gesneden met een ultramicrotoom (Ultracut E, Reichert-Jung, Leica, Wetzlar, Duitsland) met een diamantmes. De coupes werden opgevangen op een grid en gedurende 10 minuten gecontrasteerd met 2% uranylacetaat (Ultrastain, Van Hopplynus, Brussel, België) en 5 minuten met loodcitraat (Ultrastain, Van Hopplynus, Brussel, België). Uiteindelijk werden de cellen bekeken met behulp van een elektronenmicroscop (Philips EM208S, Eindhoven, Nederland) met ingebouwde camera (Kodak Megaplug Camera Model 1.6i) en verwerkt met het computerprogramma AnalySIS Pro.

5. TUNEL

De Terminal deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling of TUNEL assay werd gebruikt om DNA fragmentatie tijdens apoptose op te sporen, in primaire OLGn en OLN-93 cellen. De cellen werden hiervoor uitgezaaid op gecoate glaasjes. Na behandeling met TGF- β 1 werden ze gewassen met PBS en gedurende 15 minuten gefixeerd met 4% Unifix. De TUNEL analyse werd toegepast volgens het protocol van de TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit (Calbiochem, VWR International, Leuven, België). Eerst werd er gepermeabiliseerd door middel van proteïnase K. Daarna werden er biotine-gelabelde dUTP's en terminale deoxynucleotidyl transferasen (TdT) toegevoegd. TdT zorgt voor de incorporatie van dUTP's aan de 3'uiteinden van het gefragmenteerd DNA. Vervolgens werden er Streptavidine-Horseradish peroxidasen (HRP) toegevoegd, die een binding aangaan met de biotine-gelabelde dUTP's. HRP wordt op zijn beurt aangetoond met DAB. Uiteindelijk werden de cellen bekeken met behulp van lichtmicroscopie.

Resultaten

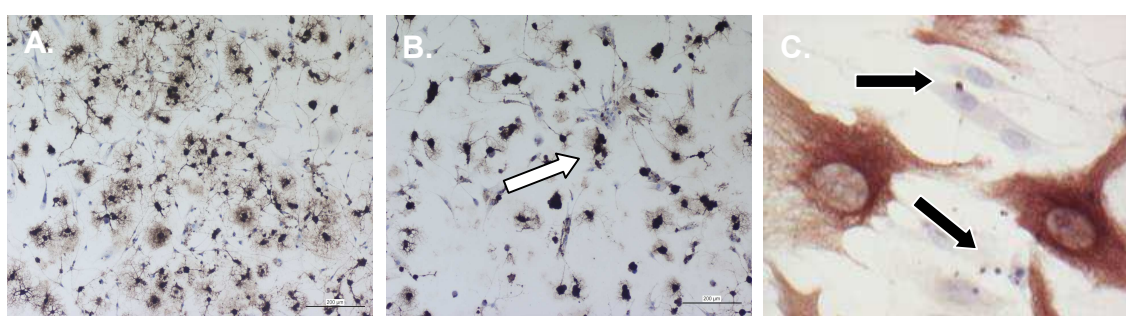
1. OLGn uit een primaire gliale cultuur

1.1 Het effect van TGF- β 1 op O-2A progenitors

1.1.1 Immunocytochemische kleuring

Er werd gebruik gemaakt van een primaire cultuur bestaande uit O-2A progenitors, radiale glia, astrocyten en microglia. Via een CDM wordt de differentiatie van de O-2A progenitors gestimuleerd. 6 dagen na de isolatie bevinden de primaire OLGn zich in het mature stadium. Om het effect van TGF- β 1 op O-2A progenitors te onderzoeken, werden de cellen 1 dag na isolatie behandeld met 50 ng/ml TGF- β 1.

Figuur 7A. toont een typisch beeld van mature OLGn, immunocytochemisch aangetoond met MAG. Ze zijn te herkennen aan hun sterk vertakte uitlopers en ronde cellichamen. Wanneer de OLGn tijdens het O-2A progenitorstadium behandeld worden met 50 ng/ml TGF- β 1 werd er op dag 6 een afname van het aantal OLGn waargenomen (Figuur 7B.). Daarnaast werden er bij de gematureerde OLGn, die de behandeling overleefden, een vormverandering en afwijkingen aan de uitlopers waargenomen (witte pijl in Figuur 7B.).



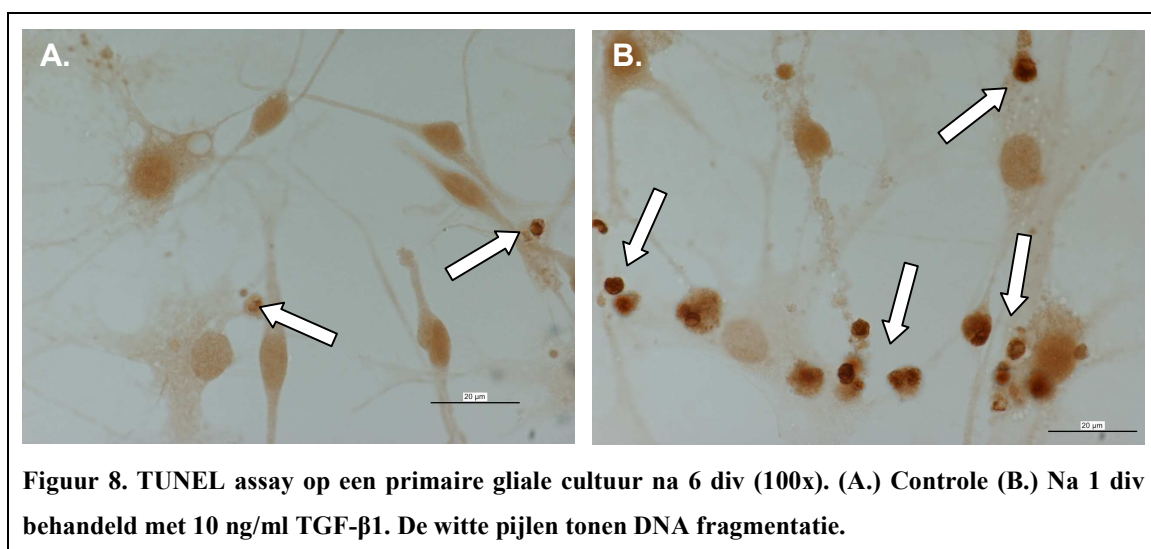
Figuur 7. Immunocytochemische kleuring van een primaire gliale cultuur na 6 div (40x).

(A.) Controle (MAG 1/750 +TX) (B.) na 1 div behandeld met 50 ng/ml TGF- β 1, verlies van uitlopers (witte pijl) (MAG 1/750 +TX) (C.) GFAP kleuring van astrocyten. HE kleuring van behandelde OLGn. Apoptotische kernen (zwarte pijlen). (div=dagen in vitro, TX=Triton-X100)

1.1.2 TUNEL assay

Vermits er na een HE kleuring bij behandelde OLGn apoptotische kernen werden waargenomen (zwarte pijlen in Figuur 7C.), werd er een TUNEL assay uitgevoerd. Hierbij wordt gefragmenteerd DNA, een typisch kenmerk van apoptose, zichtbaar gemaakt. Voor deze assay werden de O-2A progenitors op dag 1 behandeld met 10 ng/ml TGF- β 1. Na 6 dagen in vitro (div) werd er bij de behandelde OLGn een verhoogde hoeveelheid gefragmenteerd DNA waargenomen (witte pijlen in Figuur 8B.) in vergelijking met de onbehandelde OLGn (witte pijlen in Figuur 8A.).

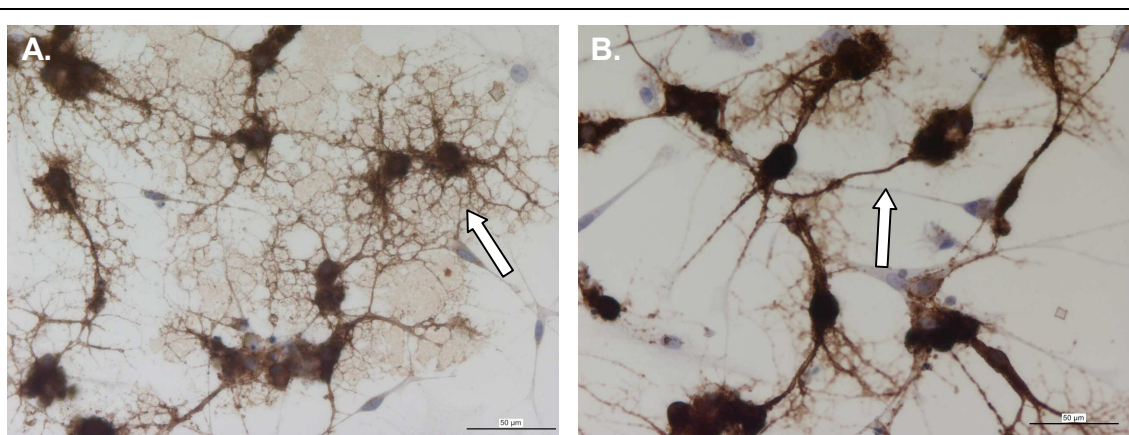
Er kan dus besloten worden dat wanneer OLGn in het O-2A progenitorstadium behandeld worden met TGF- β 1, dit een afname van het aantal OLGn en een verhoging van de hoeveelheid apoptose veroorzaakt.



Figuur 8. TUNEL assay op een primaire gliale cultuur na 6 div (100x). (A.) Controle (B.) Na 1 div behandeld met 10 ng/ml TGF- β 1. De witte pijlen tonen DNA fragmentatie.

1.2 Het effect van TGF- β 1 op mature OLGn

Na 6 div bevinden de OLGn zich in het mature stadium, dat gekenmerkt wordt door de aanwezigheid van primaire, secundaire en tertiaire uitlopers die samen een spinnenwebstructuur vormen. Figuur 9A. toont een beeld van deze typische morfologische kenmerken van mature OLGn, immunocytochemisch aangetoond met MBP (witte pijl).



Figuur 9. Immunocytochemische kleuring van een primaire gliale cultuur na 9 div (MBP 1/150 +TX) (100x) (A.) Controle (B.) Na 72u behandeling met 10 ng/ml TGF- β 1.

Figuur 9B. toont dat er na 72u behandeling met 10 ng/ml TGF- β 1 geen afname van het aantal mature OLGn plaatsvindt. Wel worden er morfologische veranderingen van de uitlopers waargenomen. De spinnenwebstructuur verdwijnt, waardoor de OLGn nog voornamelijk primaire uitlopers bezitten (witte pijl in Figuur 9B.). De expressie van MBP blijft nog steeds aanwezig. Vermits er na een HE kleuring op behandelde mature OLGn geen duidelijke wijzigingen in het aantal apoptotische kernen werd waargenomen (resultaten niet weergegeven), werd er geen TUNEL assay uitgevoerd.

2. OLN-93 cellen

2.1 Morfologische karakterisatie

Als voorbereidende studie werden de optimale cultuurcondities gezocht waarin de OLN-93 cellen zich in het meest mature stadium bevinden. Dit werd nagegaan met behulp van immunocytochemie en was nodig omdat we de effecten van TGF- β 1 op mature OLN-93 cellen willen bekijken. Het mature stadium werd vervolgens ook nog met TEM bestudeerd.

2.1.1 Immunocytochemische karakterisatie

Verschillende condities werden uitgetest waaronder het aantal dagen in cultuur, het al dan niet coaten van de glaasjes met PLL, de uitzaaidensiteit en de hoeveelheid FCS in het medium.

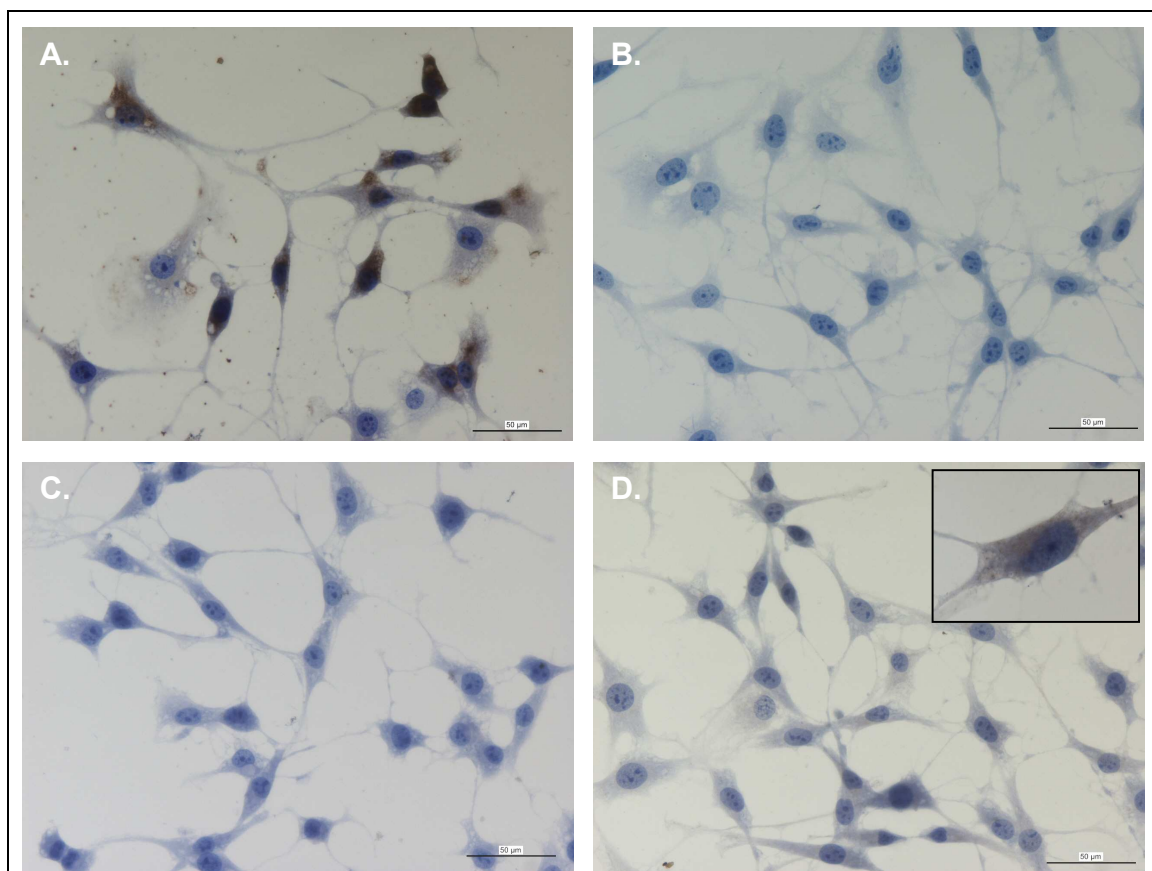
De OLN-93 cellen werden gedurende 7 dagen geïncubeerd in DMEM met 10% FCS. Vanaf dag 1 tot en met dag 7 na de uitzaaiing werden er elke dag immunocytochemische kleuringen uitgevoerd. In deze resultaten worden enkel 1, 3 en 5 div getoond.

Uit de waarnemingen bleek dat de OLN-93 cellen beter groeiden op gecoate glaasjes. De optimale uitzaaidensiteit werd vastgelegd op 2500 cellen. Bij deze hoeveelheid waren er zowel na 1 als na 7 div voldoende cellen aanwezig zonder dat er na 7 div een overmaat aan cellen werd vastgesteld.

De OLN-93 cellen werden immunocytochemisch gekleurd met een aantal veelgebruikte antilichamen typerend voor de verschillende groeistadia van de OLG. A2B5 voor het aantonen van O-2A progenitors, GalC voor het immature en MAG voor het mature stadium. Om na te gaan of de OLN-93 cellen al dan niet astrocytenmerken bezitten werd er ook een antilichaam gebruikt dat gericht is tegen GFAP, een intermediair filament in astrocyten.

Na 1 div werd een subpopulatie van de OLN-93 cellen sterk immunoreactief bevonden voor A2B5 (Figuur 10A.) en zeer zwak immunoreactief voor GFAP (Figuur 10D.). De expressie van A2B5 werd voornamelijk waargenomen ter hoogte van de cellichamen. Op het detailbeeld in Figuur 10D. is te zien dat GFAP zwak tot expressie wordt gebracht in de cellichamen en uitlopers.

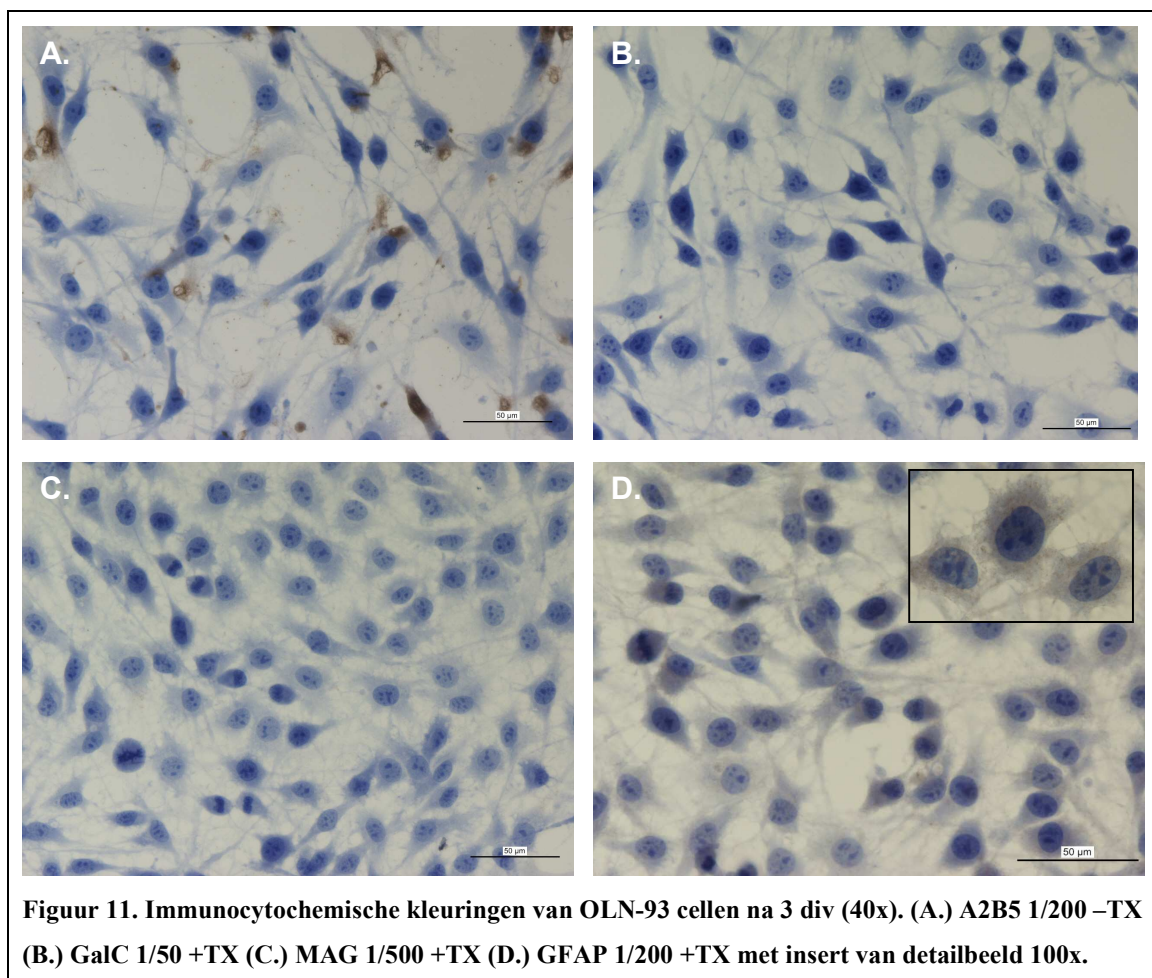
Voor GalC (Figuur 10B.) en MAG (Figuur 10C.) werd er geen immunoreactiviteit waargenomen.



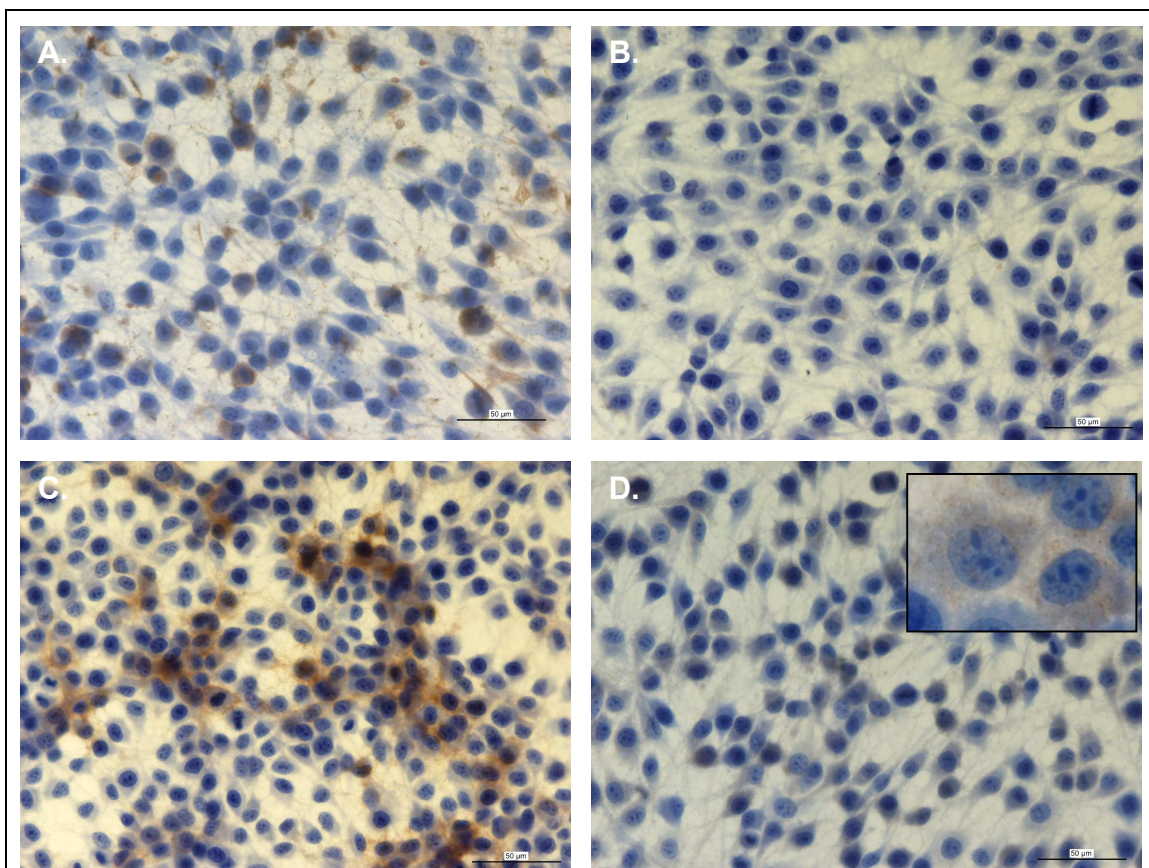
Figuur 10. Immunocytochemische kleuringen van OLN-93 cellen na 1 div (40x). (A.) A2B5 1/200 –TX (B.) GalC 1/50 +TX (C.) MAG 1/500 +TX (D.) GFAP 1/200 +TX met insert van detailbeeld 100x.

Ook na 3 div werd een subpopulatie van de OLN-93 cellen immunoreactief bevonden voor A2B5 (Figuur 11A.) en ook in mindere mate voor GFAP (Figuur 11D.). De expressie van A2B5 was niet meer zo uitgesproken als na 1 div en kwam voornamelijk voor ter hoogte van de cellichamen. Het detailbeeld in Figuur 11D. toont aan dat GFAP inderdaad immunopositief werd bevonden en dat het in de cellichamen en uitlopers tot expressie werd gebracht.

Na 3 div kon er nog steeds geen expressie van GalC (Figuur 11B.) en MAG (Figuur 11C.) worden waargenomen.

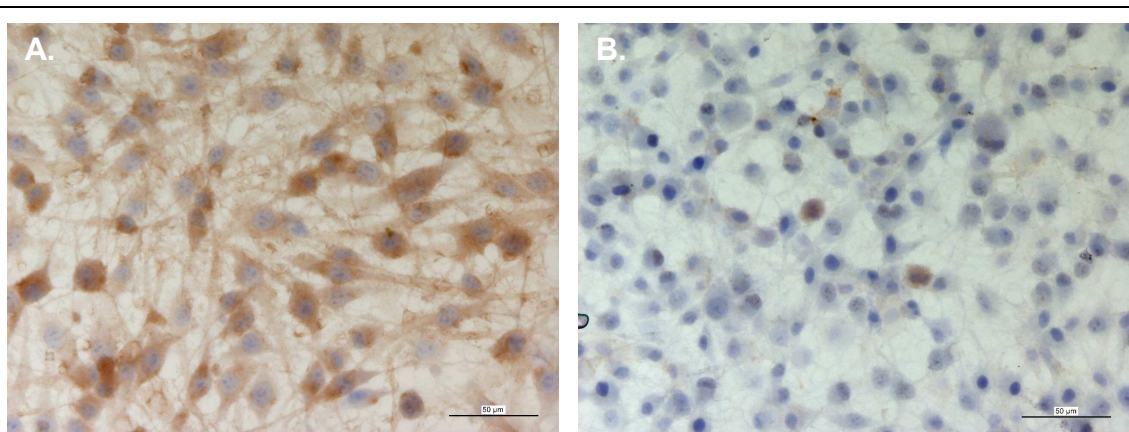


Na 5 div werd nog steeds een subpopulatie van de OLN-93 cellen immunopositief bevonden voor A2B5 (Figuur 12A.) en GFAP (Figuur 12D.). De expressie van A2B5 was voornamelijk zichtbaar in de cellichamen en GFAP werd zowel in de cellichamen als in de uitlopers zwak tot expressie gebracht. Voor GalC (Figuur 12B.) werd geen immunoreactiviteit waargenomen. De meest opmerkelijke expressieverandering, in vergelijking met de andere dagen, was de uitgesproken expressie van MAG op de cellichamen en uitlopers (Figuur 12C.). De aanwezigheid van MAG duidt erop dat OLGn zich in het mature stadium bevinden. Na deze vaststelling werd dit stadium (na 5 div) als meest matuur en ideaal bevonden voor het vervolg van het onderzoek (Ultrastructurele karakterisatie door middel van TEM en TGF- β 1 behandeling).



Figuur 12. Immunocytochemische kleuringen van OLN-93 cellen na 5 div (40x). (A.) A2B5 1/200 –TX (B.) GalC 1/50 +TX (C.) MAG 1/250 +TX (D.) GFAP 1/200 +TX met insert van detailbeeld 100x.

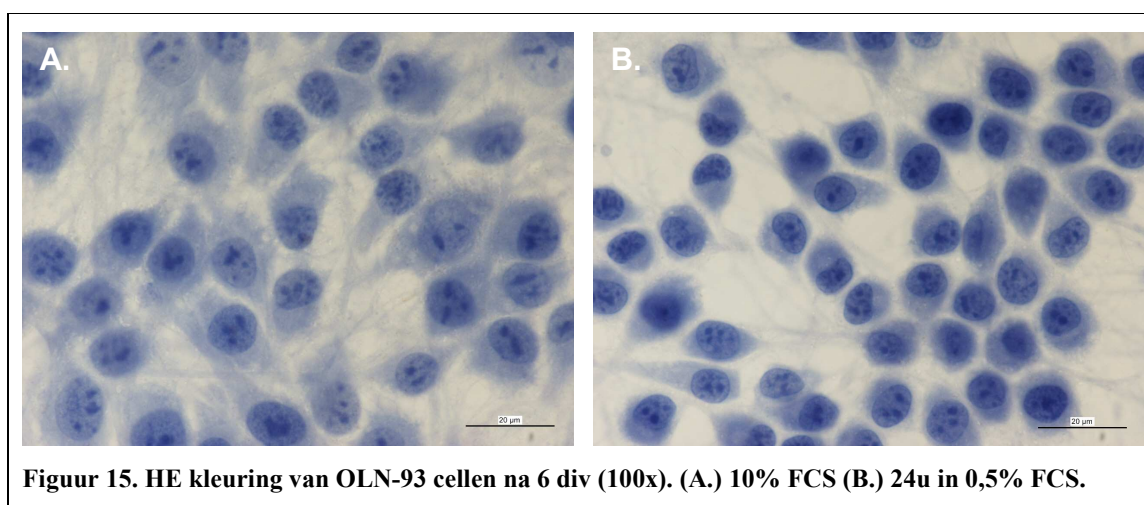
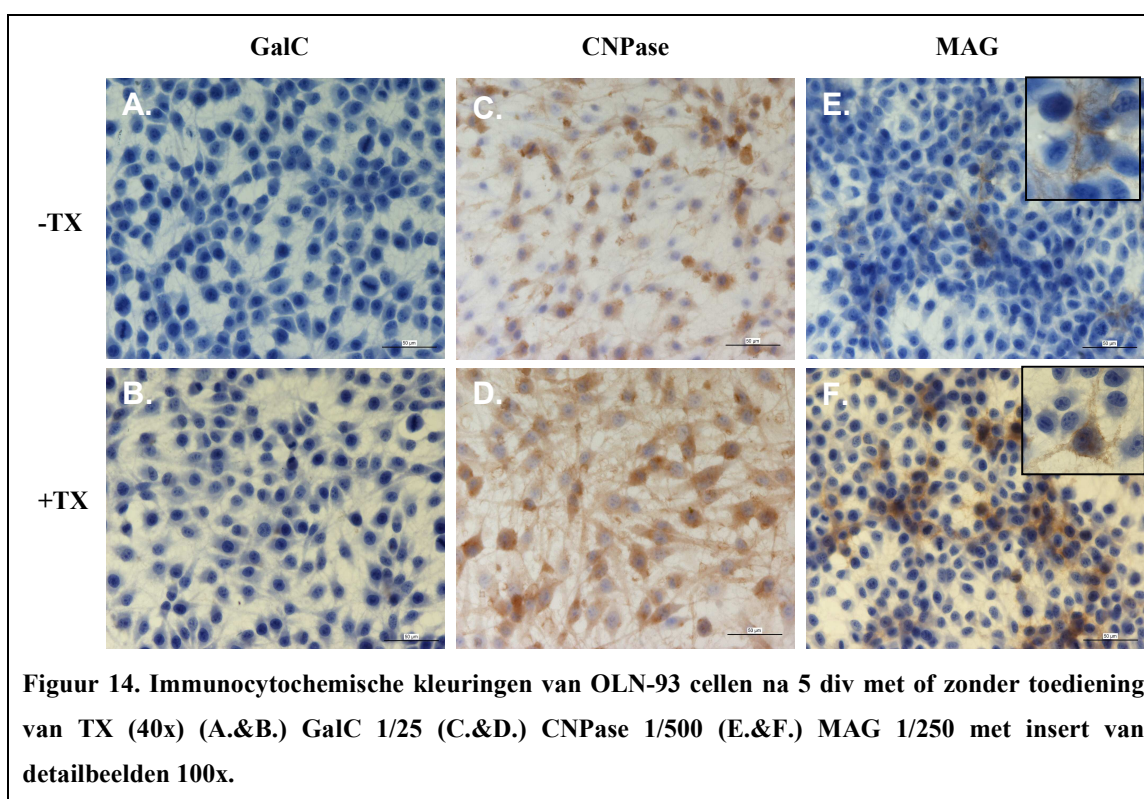
Aanvullend werd de expressie van CNPase en MBP nagegaan om de karakterisatie van de OLN-93 cellen nog meer te specificeren. CNPase is een eiwit dat het immature stadium van de OLG aankondigt en gedurende de verdere maturatie aanwezig blijft. Figuur 13A. laat zien dat er een sterke CNPase-expressie werd waargenomen, zowel in de cellichamen als in de uitlopers. MBP is een typisch eiwit voor mature OLGn. Figuur 13B. geeft weer dat er slechts een zeer zwakke immunoreactiviteit was voor MBP.



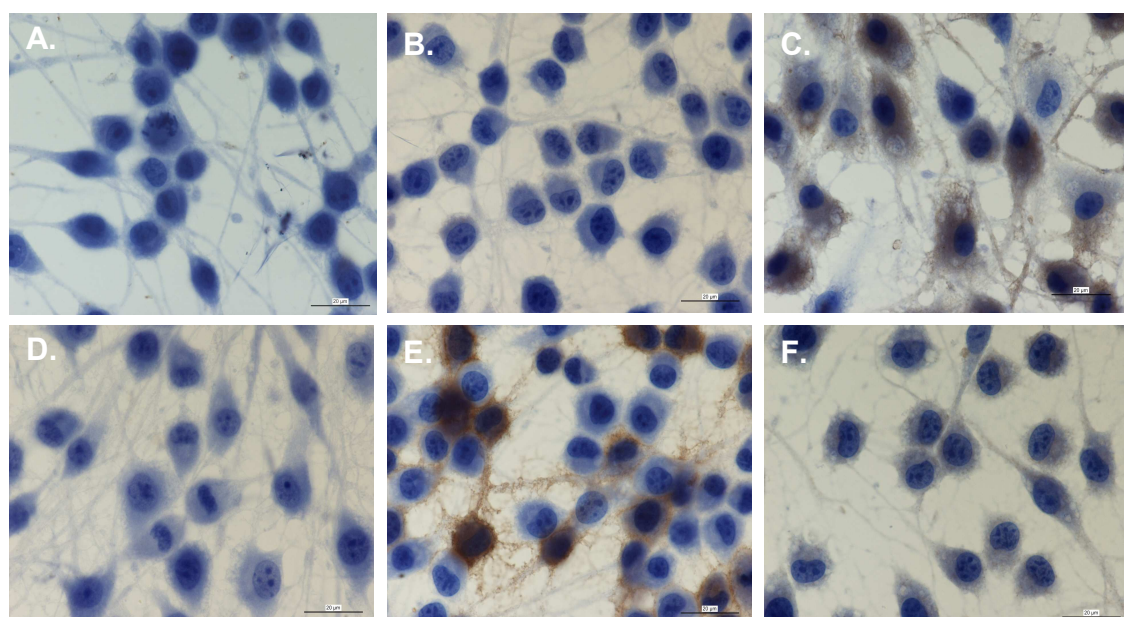
Figuur 13. Extra immunocytochemische kleuringen van OLN-93 cellen na 5 div (40x). (A.) CNPase 1/500 +TX (B.) MBP 1/100 +TX.

Bij het uitvoeren van de immunocytochemische kleuringen voor GalC, CNPase en MAG werd TX gebruikt. De antilichamen herkennen echter epitopen die zich bij mature OLGn aan de extracellulaire zijde bevinden. Alle eiwitten worden intracellulair geproduceerd. Om na te gaan of OLN-93 cellen transportmechanismen bezitten die deze eiwitten naar de extracellulaire zijde vervoeren, werden er ook kleuringen zonder TX uitgevoerd.

Figuur 14A. en B. laten zien dat niet veel verschil in immunoreactiviteit is voor GalC zonder of met toevoeging van TX. Op beide afbeeldingen is er zo goed als geen expressie van GalC te zien. Figuur 14C. toont dat de expressie van CNPase zonder toevoeging van TX zich voornamelijk ter hoogte van de cellichamen uit. Na toevoeging van TX wordt er een zeer sterke immunoreactiviteit voor CNPase waargenomen, die zich zowel op de cellichamen als de uitlopers situeert (Figuur 14D.). Figuur 14E. geeft weer dat MAG zich op het buitenoppervlak van de celuitlopers bevindt. Na toevoeging van TX is er ook voor MAG meer kleuring zichtbaar (Figuur 14F.)



Een laatste conditie die bij OLN-93 cellen van 5 div getest werd was de invloed van de hoeveelheid FCS in het medium. De hoeveelheid FCS werd verlaagd van 10% naar 0,5%. Figuur 15A. laat zien dat OLN-93 cellen, die 6 dagen op 10% FCS hebben doorgebracht, multipolair zijn. Daarnaast krijgen de mature OLN-93 cellen na 24u incubatie in medium met 0,5% FCS een rondere vorm, donkerdere kernen en minder uitlopers.



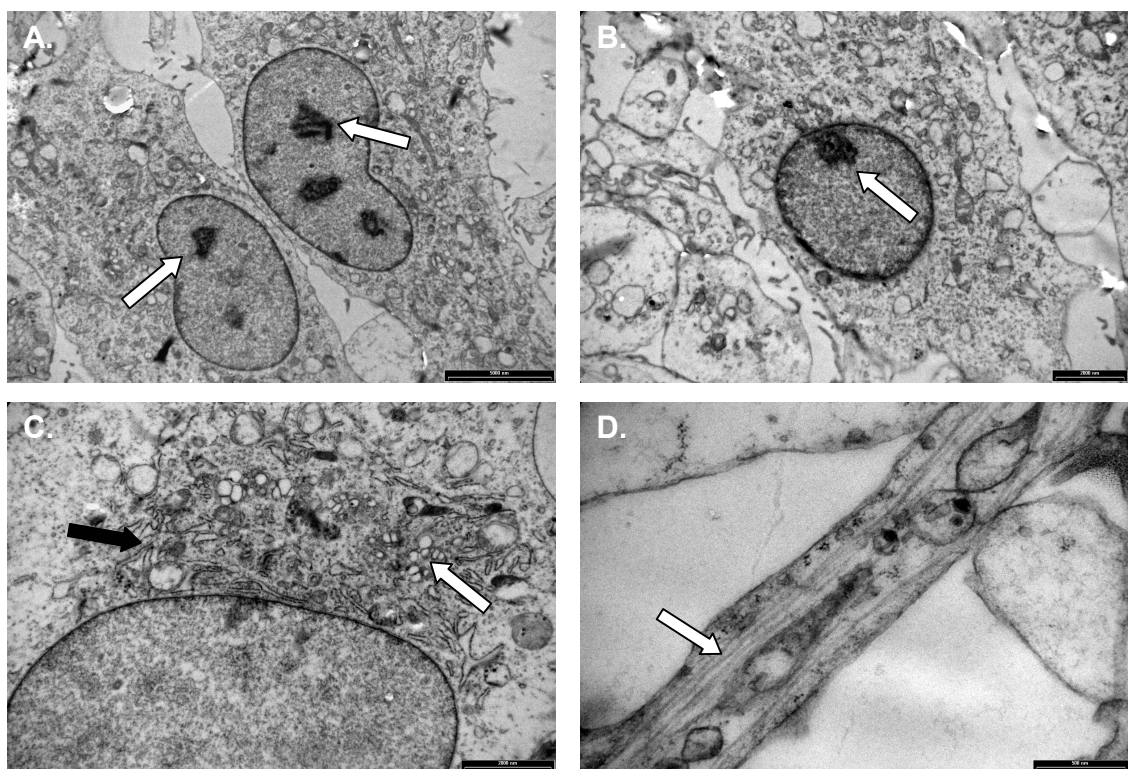
Figuur 16. Immunocytochemische kleuringen van OLN-93 cellen van 6 div na 24u incubatie in medium met 0,5% FCS (100x). (A.) A2B5 1/200 -TX (B.) GalC 1/25 +TX (C.) CNPase 1/500 -TX (D.) MBP 1/100 +TX (E.) MAG 1/250 -TX (F.) GFAP 1/200 +TX.

Om na te gaan of de FCS vermindering invloed heeft op de eiwitexpressie, werden er immunocytochemische kleuringen uitgevoerd. Na 24u incubatie in medium met 0,5% FCS werd er geen immunoreactiviteit waargenomen voor A2B5 (Figuur 16A.), GalC (Figuur 16B.) en MBP (Figuur 16D.). CNPase (Figuur 16C.) en GFAP (Figuur 16F.) werden zwak tot expressie gebracht. Figuur 16E. toont dat er zowel in de cellichamen als in de uitlopers een zeer sterke immunoreactiviteit is voor MAG. Bij de immunocytochemische kleuring van MAG werd er geen gebruik gemaakt van TX om zeker na te gaan hoeveel MAG tot expressie werd gebracht aan de extracellulaire zijde van het celmembraan.

2.1.2 Ultrastructurele karakterisatie

Ultrastructureel werden OLN-93 cellen van 5 div in medium met 10% FCS bestudeerd door middel van TEM. De celkernen zijn variabel van vorm, euchromatisch en bevatten 1 of meerdere prominente nucleoli (witte pijlen in Figuur 17A. en B.). Het perinucleaire cytoplasma bevat een uitgebreid RER (zwarte pijl in Figuur 17C.) en een goed ontwikkeld golgi apparaat (witte pijl in Figuur 17C.). De uitlopers bezitten een groot aantal microtubuli, parallel met de lengterichting van de uitlopers (witte pijl in Figuur 17D.).

OLN-93 cellen die 24u in medium met 0,5% FCS zaten werden ook door middel van TEM bekeken, maar op ultrastructureel niveau konden weinig veranderingen worden aangetoond (resultaten niet weergegeven).



Figuur 17. TEM beelden van OLN-93 cellen van 5 div (10% FCS). (A.) 2 cellen met ovale kernen en meerdere nucleoli (witte pijlen) (B.) Cel met ronde kern en 1 nucleolus (witte pijl) (C.) Detailbeeld van de kern, RER (zwarte pijl) en golgi apparaat (witte pijl) (D.) Detailbeeld van een uitloper met parallelle microtubuli (witte pijl).

2.2 Het effect van TGF- β 1 op OLN-93 cellen

Na de morfologische karakterisatie werd het stadium waarin de OLN-93 cellen zich na 5 div bevinden gebruikt als model voor mature OLGn. De cellen werden op 5 div behandeld met TGF- β 1 en op 6 div werden de effecten ervan bestudeerd.

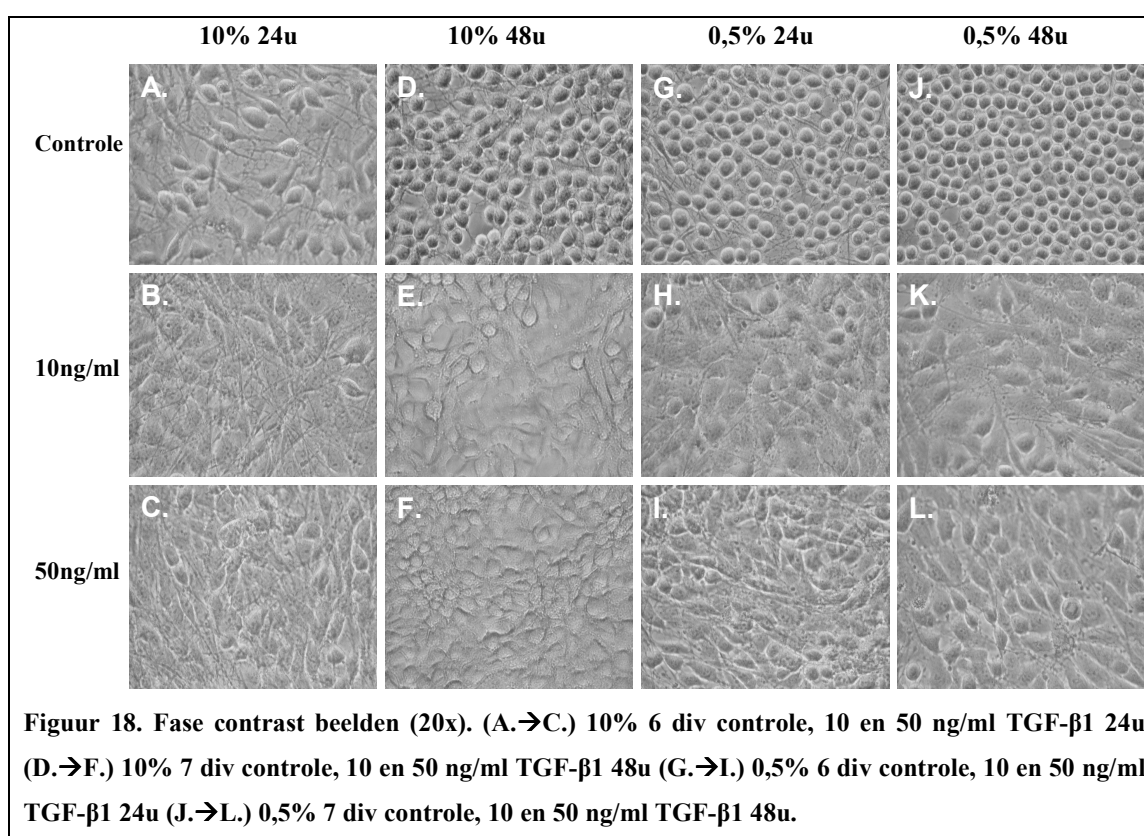
FCS bevat een groot aantal factoren die het effect van TGF- β 1 eventueel kunnen beïnvloeden. Daarom werden de behandelingen uitgevoerd in DMEM met 10% FCS en in DMEM met 0,5% FCS.

Om een algemeen overzicht te krijgen van de morfologische veranderingen die TGF- β 1 veroorzaakt in OLN-93 cellen werd er eerst fase contrast microscopie toegepast. Door middel van flow cytometrie (FACS) en TUNEL assay probeerden we te achterhalen of TGF- β 1 al dan niet apoptose veroorzaakt bij OLN-93 cellen van 5 div. Met behulp van immunocytochemie wilden we nagaan of de morfologische veranderingen invloed hadden op de immuno-expressie. Tot slot werden mogelijke ultrastructurele wijzigingen nagegaan met behulp van TEM.

2.2.1 Fase Contrast Microscopie

De cellen werden na 5 div zowel in medium met 10% FCS als met 0,5% FCS, gedurende 24u en 48u behandeld met 10 en 50 ng/ml TGF- β 1.

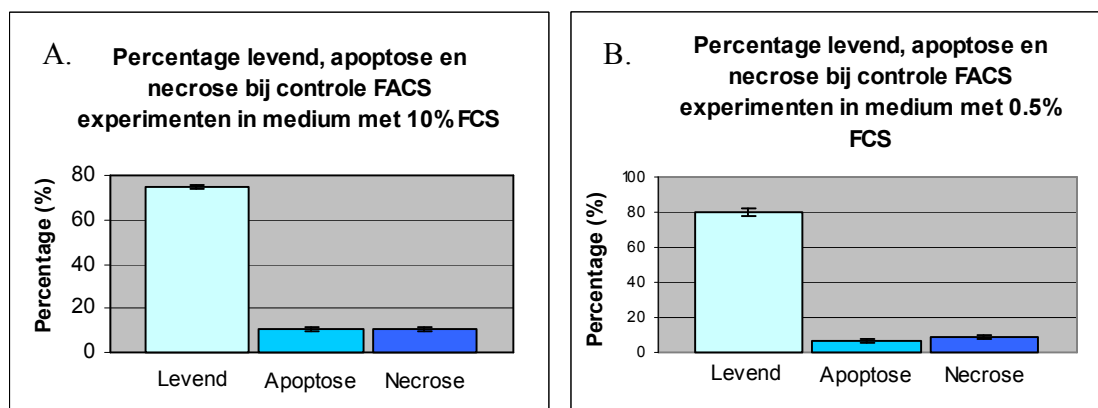
Figuur 18 toont dat er reeds na 24u behandeling morfologische veranderingen werden gezien. In vergelijking met de controlecellen leken de behandelde cellen zowel in 10% als in 0,5% FCS veel vlakker met een meer uitgespreid cytoplasma. Door de vergroting van het celoppervlak was er een toename in de intercellulaire contacten. Na 48u behandeling waren de morfologische veranderingen nog steeds aanwezig.



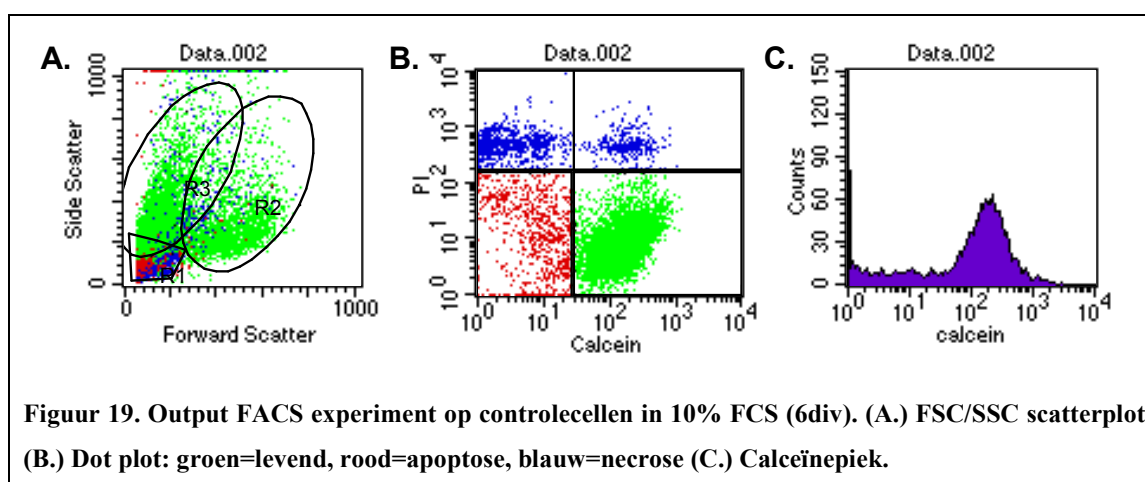
2.2.2 Detectie van apoptose met behulp van flow cytometrie (FACS)

Op de fase contrast beelden werden geen tekenen van celdood bespeurd. Om dit ook effectief te bewijzen werden er flow cytometrische analyses uitgevoerd met behulp van de FACS.

In eerste instantie werden er FACS experimenten uitgevoerd op controle OLN-93 cellen in 10% en 0,5% FCS. Dit diende om na te gaan hoeveel apoptose er gemiddeld in een onbehandelde cultuur voorkomt. Grafiek 1A. en 1B. tonen de percentages levende, apoptotische en necrotische cellen bij controle FACS experimenten van OLN-93 cellen van 6 div en dit zowel in medium met 10% FCS als in medium met 0,5% FCS. Bij 10% FCS waren er gemiddeld 75% levende cellen en lagen de percentages van apoptose en necrose beiden gemiddeld rond 10%. Bij 0,5% FCS waren er gemiddeld 79% levende cellen en bedroeg het percentage apoptose gemiddeld 7% en het percentage necrose gemiddeld 9%.



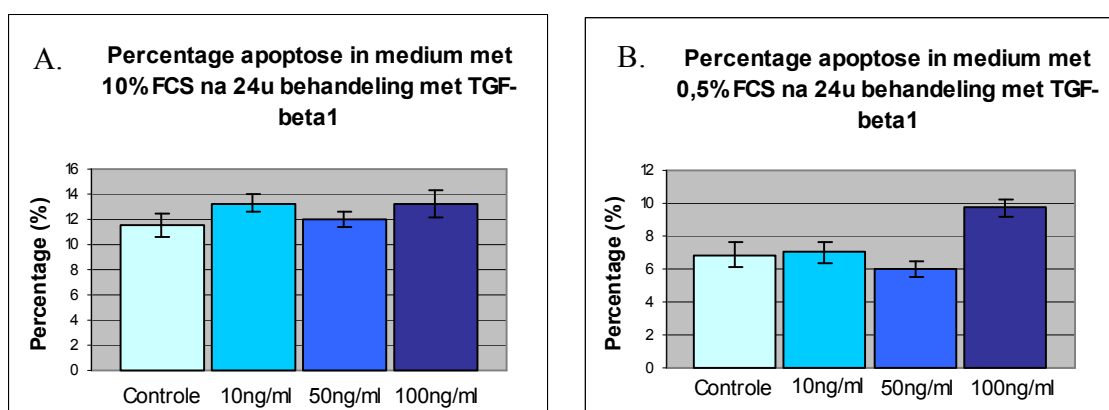
Grafiek 1: Het percentage levende, apoptotische en necrotische OLN-93 cellen van 6 div bij controle FACS experimenten (A) in medium met 10% FCS (B) in medium met 0,5% FCS.



Figuur 19. Output FACS experiment op controlecellen in 10% FCS (6div). (A.) FSC/SSC scatterplot (B.) Dot plot: groen=levend, rood=apoptose, blauw=necrose (C.) Calceïnepiek.

Figuur 19A. toont een forward scatter/side scatter (FSC/SSC) scatterplot van een FACS experiment op controlecellen van 6 div in 10% FCS. Deze FSC/SSC scatter plot geeft de geselecteerde celpopulaties weer. Figuur 19B. toont een dot plot waarop de levende cellen in het groen, de apoptotische in het rood en de necrotische in het blauw worden aangeduid. Door de kleurcodes kunnen de cellen uit Figuur 19B. teruggevonden worden in Figuur 19A. De kwadranten van de dot plot worden ingedeeld naar hoge of lage hoeveelheden calceïne en PI. Levende cellen bevinden zich in het kwadrant waar hoge hoeveelheden calceïne en lage hoeveelheden PI worden opgemeten (groen). Apoptotische cellen bevatten weinig calceïne en weinig PI (rood). Necrotische cellen bevatten veel PI

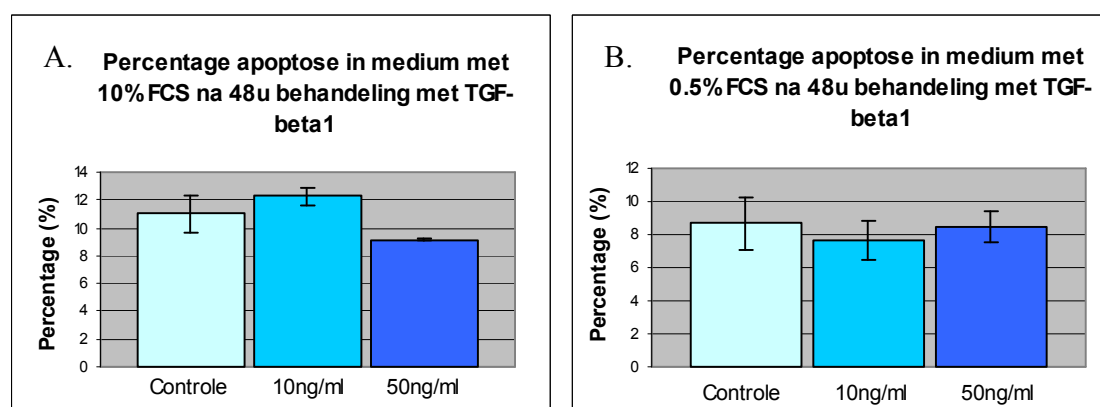
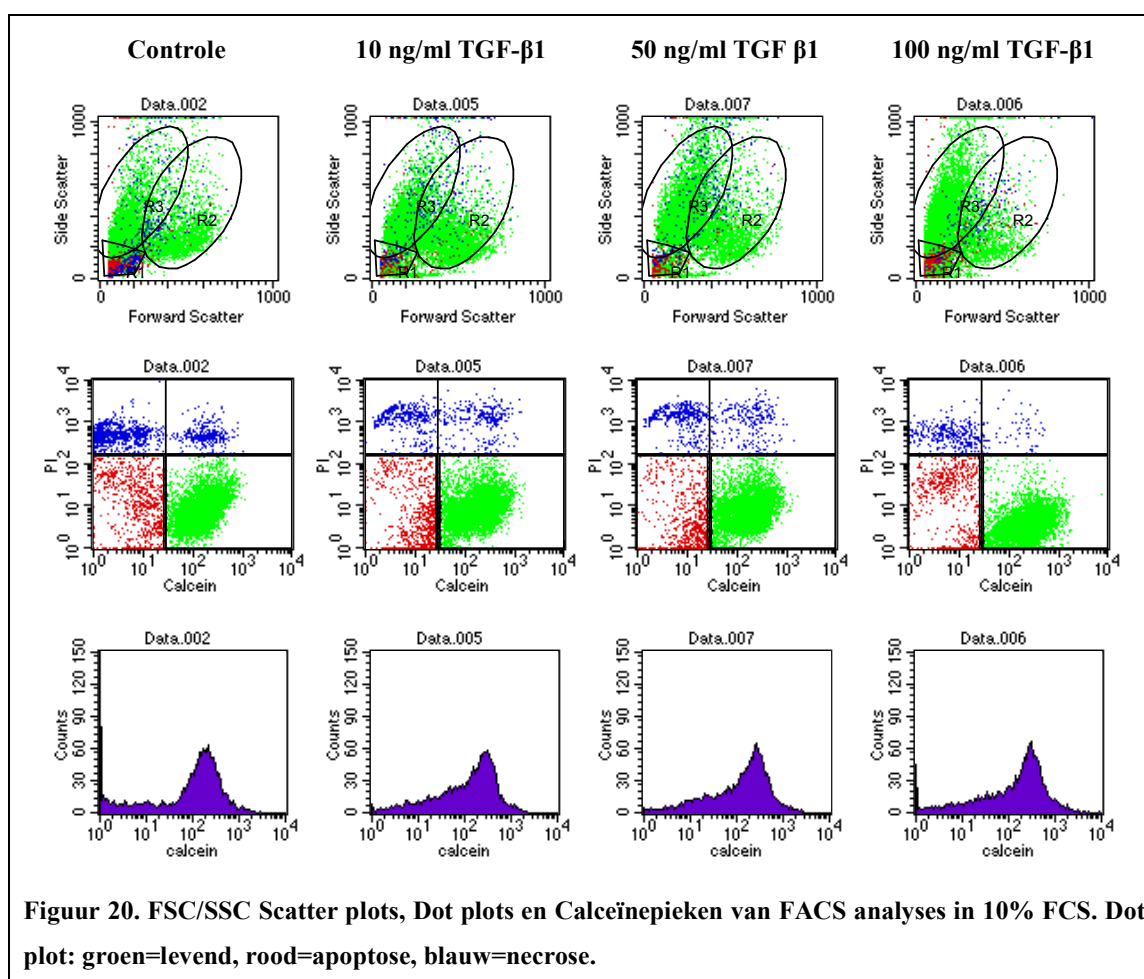
(blauw gebied links), maar cellen die secundaire necrose ondergingen kunnen eveneens calceïne bevatten (blauw gebied rechts). De calceïnepiek geeft de verhouding weer tussen de hoeveelheid calceïne en het aantal cellen dat deze hoeveelheid bezit (Figuur 19C.).



Grafiek 2: Het percentage apoptose bij OLN-93 cellen van 6div, zowel controle als na 24u behandeling met 10, 50 en 100ng/ml TGF- β 1 (A.) in medium met 10% FCS (B.) in medium met 0,5% FCS.

De OLN-93 cellen werden op 5 div gedurende 24u behandeld met 10, 50 en 100 ng/ml TGF- β 1 in medium met 10% FCS en 0,5% FCS. Grafiek 2 geeft het percentage apoptotische cellen weer bij controle en 24u behandelde OLN-93 cellen in 10% (A.) en 0,5% FCS (B.). Zowel bij 10% FCS als bij 0,5% FCS werden er gelijkaardige resultaten gevonden voor de verschillende concentraties TGF- β 1. Na statistische analyse bleek dat er geen significante verschillen waren in het percentage apoptose tussen de verschillende toegediende dosissen TGF- β 1 na 24u behandeling.

Figuur 20 geeft een overzichtje van de FSC/SSC scatterplots, dot plots en calceïnepieken van controle en 24u behandelde OLN-93 cellen met 10, 50 en 100 ng/ml TGF- β 1 in 10% FCS. Wanneer FSC/SSC scatter plots, dot plots en calceïnepieken met elkaar vergeleken worden zijn er eveneens geen dosisafhankelijke verschillen in apoptose te zien na 24u behandeling met TGF- β 1.



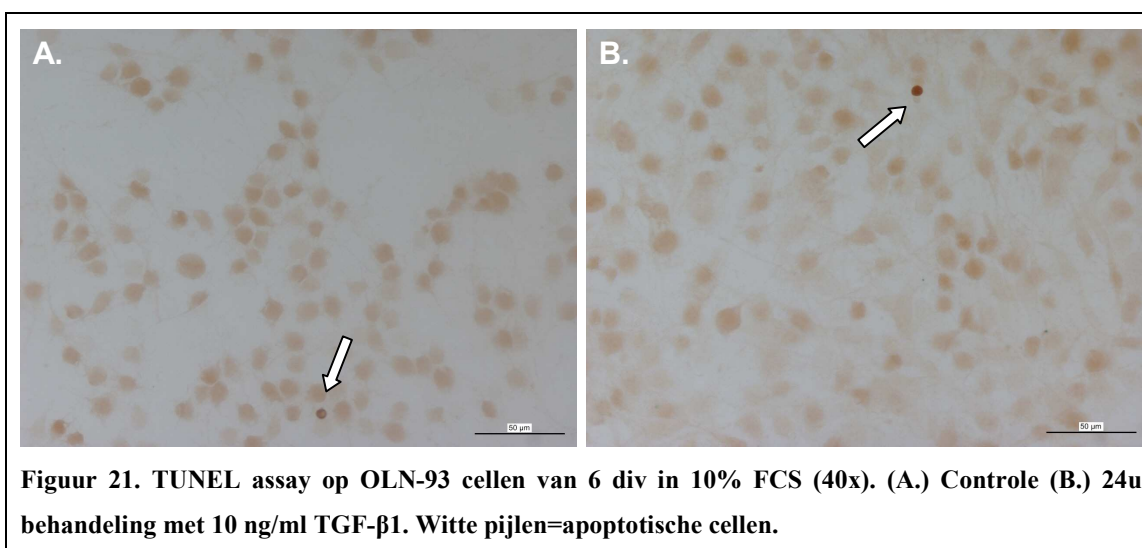
Grafiek 3: Het percentage apoptose bij OLN-93 cellen van 7div, zowel controle als na 48u behandeling met 10 en 50ng/ml TGF-β1 (A.) in medium met 10% FCS (B.) in medium met 0,5% FCS.

Om na te gaan of de behandeling met TGF- β 1 tijdsafhankelijke verschillen in hoeveelheid apoptose veroorzaakt, werden de OLN-93 cellen vervolgens gedurende 48u behandeld met 10 en 50 ng/ml TGF- β 1.

Grafiek 3 toont het percentage apoptotische cellen bij controle OLN-93 cellen en na 48u behandeling in 10% (A.) en 0,5% FCS (B.). Na statistische analyse bleek dat er eveneens geen significante verschillen waren in het percentage apoptotische cellen tussen de verschillende toegediende dosissen TGF- β 1 na 48u behandeling.

2.2.3 TUNEL assay

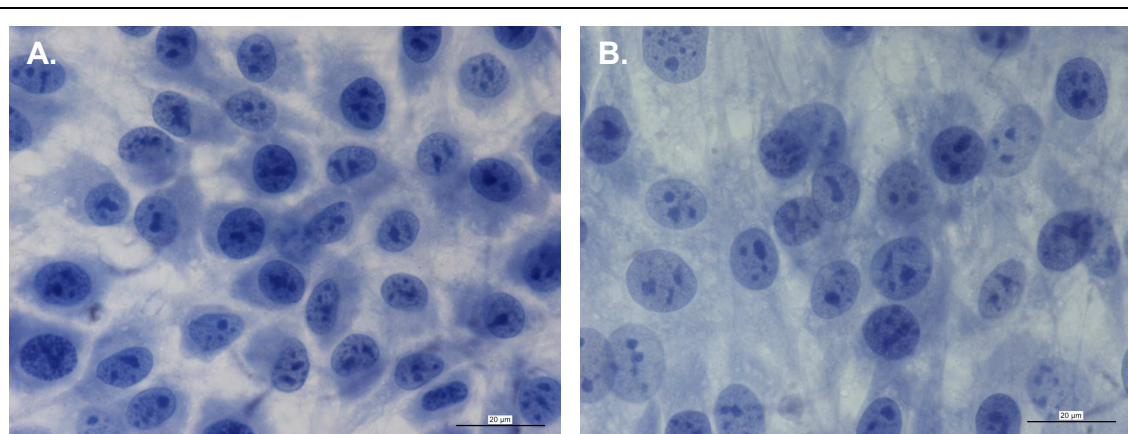
Na het uitvoeren van de FACS analyses werden er geen verschillen in hoeveelheid apoptose aangetoond na toediening van stijgende dosissen TGF- β 1 en bij verschillende behandelingsduren. Om dit te verifiëren werd er een TUNEL assay uitgevoerd op controle OLN-93 cellen van 6 div in 10% FCS en na 24u behandeling met 10 ng/ml TGF- β 1. Figuur 21A. laat zien dat er bij controlecellen hier en daar een apoptotische cel wordt waargenomen (witte pijl). Na 24u behandeling met TGF- β 1 is geen stijging in de hoeveelheid apoptotische cellen waargenomen (Figuur 21B.). Deze resultaten bevestigen de conclusie dat TGF- β 1 na 24u behandeling geen apoptose veroorzaakt in OLN-93 cellen van 5 div.



2.2.4 Immunocytochemische kleuring

Om na te gaan of de morfologische veranderingen, veroorzaakt door TGF- β 1, invloed hebben op de immunoreactiviteit van bepaalde eiwitten of lipiden, werden immunocytochemische kleuringen uitgevoerd.

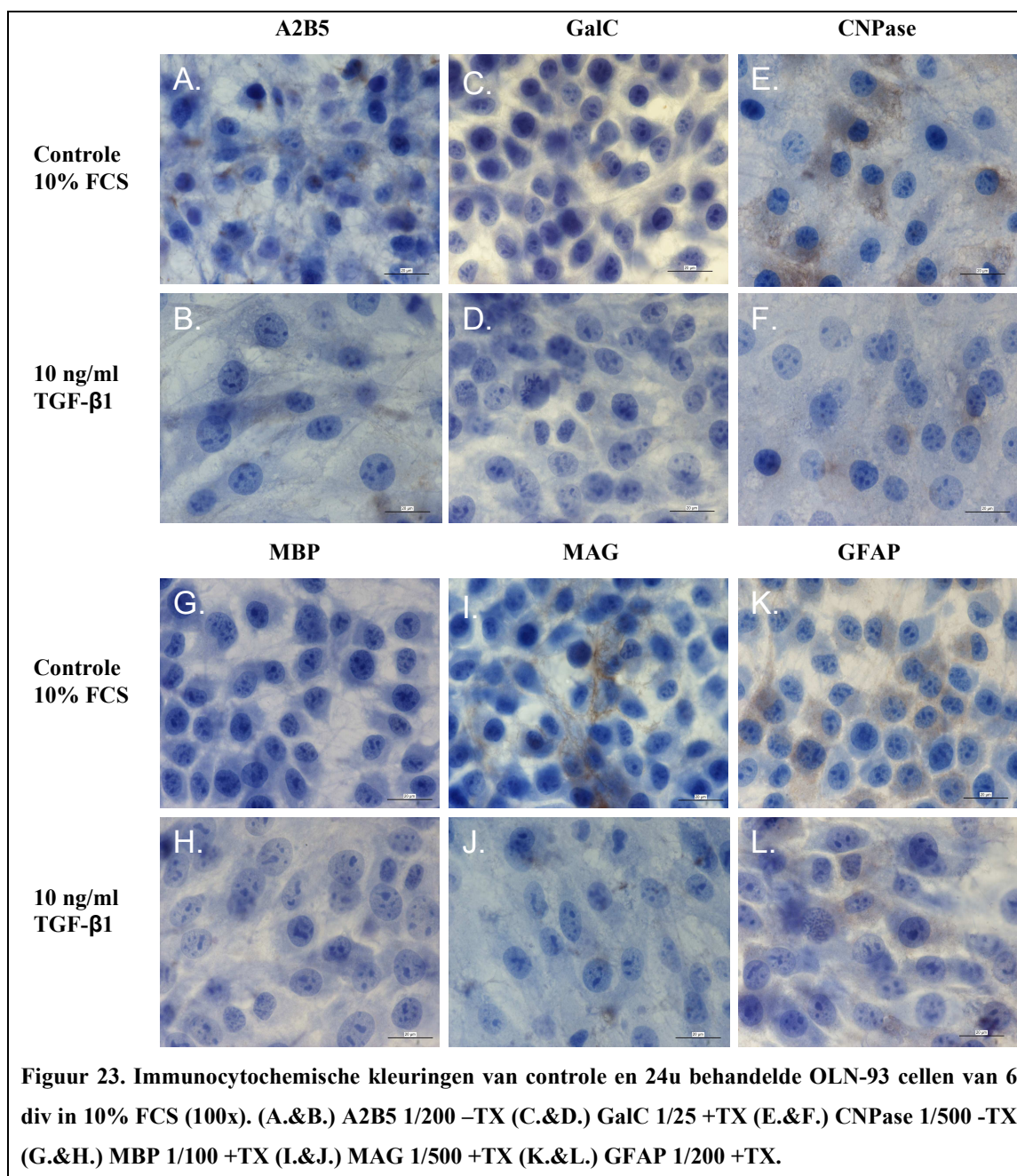
Om enkel de morfologische veranderingen te zien, werd eerst een HE kleuring uitgevoerd op controle en 24u behandelde OLN-93 cellen (10 ng/ml TGF- β 1) van 6 div. Figuur 22A. toont onbehandelde OLN-93 cellen van 6 div in 10% FCS. Na behandeling met TGF- β 1 treedt er een kernhypertrofie op (Figuur 22B.). De cellen zijn veel vlakker en hebben een uitgesmeerd cytoplasma, waardoor het cel-celcontact toeneemt. Op sommige plaatsen lijken de cellen in verschillende lagen over mekaar te groeien. Daarnaast zijn er bijna geen afzonderlijke uitlopers meer zichtbaar, wat erop kan wijzen dat deze verdwenen of misvormd zijn.



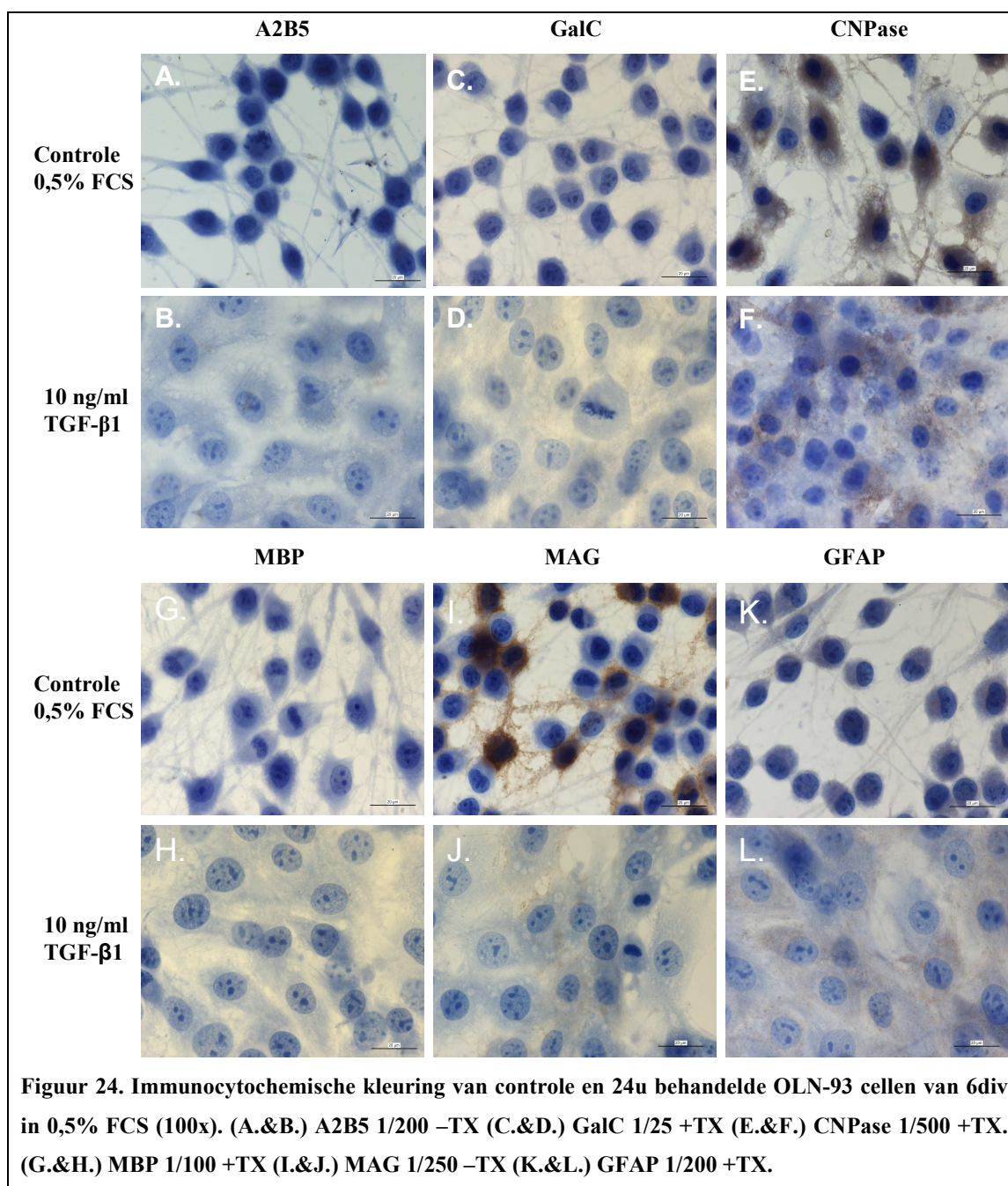
Figuur 22. HE kleuring van OLN-93 cellen van 6 div in 10% FCS (100x) (A.) Controle (B.) na 24u behandeling met 10 ng/ml TGF- β 1.

Voor de immunocytochemische kleuringen werden de OLN-93 cellen eveneens op 5 div gedurende 24u behandeld met 10 ng/ml TGF- β 1. De immunoreactiviteit voor A2B5 bij controlecellen (Figuur 23A.) lijkt meer uitgesproken dan na behandeling met TGF- β 1 (Figuur 23B.). Figuur 23C. en D. tonen dat er zowel bij controle als behandelde OLN-93 cellen geen verschil in immunoreactiviteit voor GalC optreedt. Bij controlecellen (Figuur 23E.) lijkt er meer CNPase-expressie aanwezig dan bij behandelde OLN-93 cellen (Figuur 23F.). Figuur 23G. en H. geven aan dat er geen verschil is tussen de immunoreactiviteit van MBP bij controle en behandelde OLN-93 cellen. Na 6 div is bij

de controlecellen een sterke immunopositiviteit voor MAG te zien (Figuur 23I.), die sterk verminderd na behandeling met TGF- β 1 (Figuur 23J.). Ook de expressie van GFAP is bij de controlecellen (Figuur 23K.) meer uitgesproken dan bij behandelde OLN-93 cellen (Figuur 23L.). De waarnemingen doen uitschijnen dat er een verminderde immunoreactiviteit optreedt na 24u behandeling met TGF- β 1.



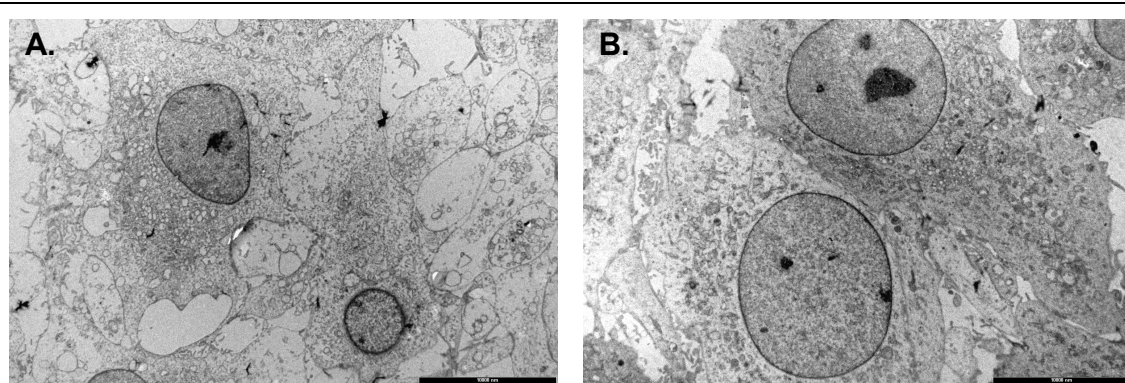
Door de eventuele beïnvloeding van het FCS in het medium werd het effect van TGF- β 1 op OLN-93 cellen eveneens bestudeerd in DMEM met 0,5% FCS. Op 5 div werden de OLN-93 cellen gedurende 24u in medium met 0,5% FCS geplaatst en gelijktijdig behandeld met 10 ng/ml TGF- β 1 gedurende 24u.



Figuur 24A. toont OLN-93 cellen op 0,5% FCS die een typische bipolaire, ronde vorm gekregen hebben. Ze vertonen geen immunoreactiviteit voor A2B5. Na behandeling met TGF- β 1 vertonen de cellen dezelfde morfologische veranderingen als bij 10% FCS. Ook hier worden de cellen immunonegatief bevonden voor A2B5 (Figuur 24B.). Figuur 24C. en D. tonen dat er zowel bij controle als behandelde OLN-93 cellen geen verschil in immunoreactiviteit voor GalC optreedt. De expressie van CNPase is bij onbehandelde cellen (Figuur 24E.) meer uitgesproken dan na behandeling met TGF- β 1 (Figuur 24F.). Ook de immunoreactiviteit voor MBP vertoont geen verschillen bij controle (Figuur 24G.) en behandelde cellen (Figuur 24H.). Figuur 24I. laat een zeer sterke immunoreactiviteit voor MAG zien bij controlecellen op 0,5% FCS. Na behandeling met TGF- β 1 is deze beduidend minder (Figuur 24J.). Voor GFAP lijkt er eveneens een vermindering in immunoreactiviteit opgetreden na behandeling met TGF- β 1 (Figuur 24L.) Na deze waarnemingen kan er gesteld worden dat er zowel bij 10% als bij 0,5% FCS, na behandeling met TGF- β 1, een mogelijke vermindering in immunoreactiviteit is opgetreden.

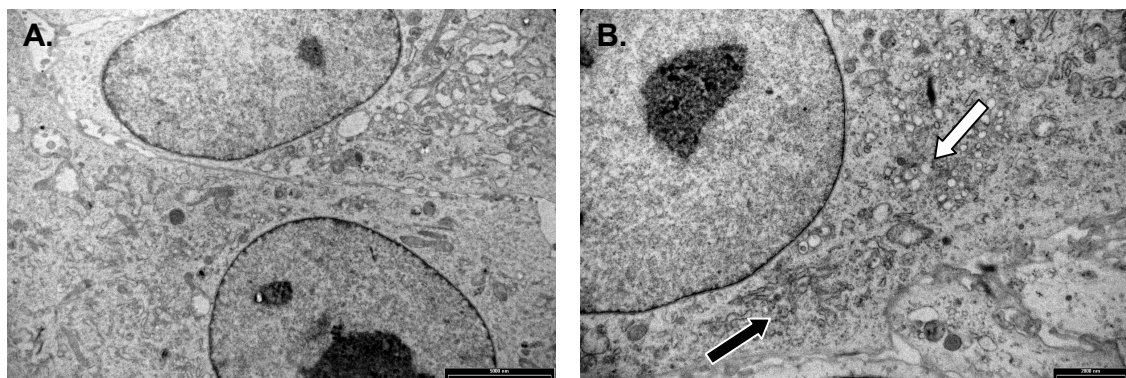
2.2.5 TEM

Ook op ultrastructureel niveau zijn er morfologische verschillen merkbaar. Figuur 25A. toont onbehandelde OLN-93 cellen van 6 div in medium met 10% FCS.



Figuur 25. TEM beelden van OLN-93 cellen van 6 div (10% FCS). (A.) Controle cellen (B.) 24u behandeling met 10ng/ml TGF- β 1.

Figuur 25B., met dezelfde vergroting als Figuur 25A., laat zien dat na 24u behandeling met 10 ng/ml TGF- β 1 een kernhypertrofie optreedt. Daarnaast lijkt het cytoplasma meer uitgesmeerd waardoor het cel-celcontact vergroot. Hierdoor zijn afzonderlijke cellen moeilijk af te bakenen. Verder wordt er waargenomen dat de uitlopers verdwijnen of misvormen door het uitdijen van het cytoplasma. Hierdoor zijn er minder parallelle microtubuli zichtbaar.



Figuur 26. Detail TEM beelden van behandelde OLN-93 cellen (10 ng/ml TGF- β 1) van 6 div op 10% FCS. (A.) ... (B.) Detailbeeld van kern met nucleolus

In detail zijn de celgrenzen nog moeilijk te onderscheiden (Figuur 26A.). Perinucleair vertonen de behandelde cellen eveneens een uitgebreid RER (zwarte pijl in Figuur 26B.) en een goed ontwikkeld golgi apparaat (witte pijl in Figuur 26B.). De OLN-93 cellen op 0,5% FCS vertoonden na behandeling gelijkaardige ultrastructurele veranderingen.

Discussie

In dit onderzoek wilden we het effect van TGF- β 1 op O-2A progenitors en mature OLGn bestuderen. De O-2A progenitors werden geïsoleerd uit primaire gliale culturen van neonatale ratjes en waren na 6 div gedifferentieerd tot mature OLGn. Om het effect van TGF- β 1 op de O-2A progenitors te onderzoeken, werden de cellen 1 dag na isolatie behandeld met TGF- β 1. Uit ons onderzoek bleek dat er na 6 dagen een afname van het aantal mature OLGn plaatsvond, in vergelijking met onbehandelde culturen. De gedifferentieerde O-2A progenitors die de behandeling overleefd hadden, vertoonden morfologische veranderingen, waaronder het verlies en misvormen van de uitlopers. Ondanks deze wijzigingen bij mature OLGn, had TGF- β 1 geen invloed op het differentiatieproces van O-2A progenitors, aangezien de OLGn nog steeds MAG tot expressie brachten. Een HE kleuring en TUNEL assay toonden aan dat er na behandeling met TGF- β 1 een verhoogd aantal apoptotische celkernen werden waargenomen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de afname van het aantal OLGn, na behandeling met TGF- β 1 in het progenitorstadium, een gevolg is van een stijging in apoptose. Onze bevindingen stemmen overeen met enkele recente studies die aantonen dat TGF- β 1 apoptose kan induceren in O-2A progenitors. Chao et al (6) toonde dit aan in neonatale O-2A progenitors van de rat (3 div) en Schuster et al (28) gebruikte de O-2A progenitorcellijn OLI-neu en kwam tot dezelfde conclusies.

Wanneer de primaire OLGn pas na 6 div, in het mature stadium, gedurende 72u behandeld werden met TGF- β 1, vond er geen afname van het aantal mature OLGn plaats, maar werden er morfologische veranderingen aan de uitlopers waargenomen. De typische spinnenwebstructuur leek te verdwijnen, waardoor er voornamelijk primaire uitlopers overbleven. Na uitvoering van een HE kleuring werd er geen verhoging in apoptotische celkernen waargenomen. Er wordt gesuggereerd dat de TGF- β 1-geïnduceerde apoptose gekoppeld wordt aan een groeistop in prolifererende cellen. Mature cellen zijn hiervoor minder vatbaar doordat ze volledig gedifferentieerd zijn en dus niet meer prolifereren (6). Er kan dus besloten worden dat TGF- β 1 een verhoging in de apoptose bij O-2A

progenitors veroorzaakt en eveneens verantwoordelijk is voor morfologische veranderingen tijdens de differentiatie, alsook bij mature OLGn.

Om het effect van TGF- β 1 op mature OLGn verder uit te diepen, werd er gezocht naar een model voor mature OLGn. Primaire culturen bestaan vaak uit verschillende celtypen en in dit onderzoek was er nood aan een zuivere cultuur die makkelijk te onderhouden was. Daarom werd er gekozen voor een cellijn. Cellijnen vereisen geen omslachtige isolatieprocedures, zijn altijd beschikbaar en bestaan uit 1 celtype. Er werd besloten om de cellijn OLN-93 te gebruiken die door Richter-Landsberg et al (33) beschreven wordt als een cellijn met eigenschappen van mature OLGn. Om na te gaan wanneer de OLN-93 cellen zich in het meest mature stadium bevinden, werd er eerst een morfologische karakterisatie uitgevoerd met behulp van immunocytochemie en TEM. Voor de immunocytochemische karakterisatie werden een aantal condities getest, waarvan het aantal dagen in cultuur en de hoeveelheid FCS in het medium de belangrijkste waren. De OLN-93 cellen werden gedurende 7 dagen geïncubeerd in DMEM met 10% FCS. Vanaf dag 1 tot en met dag 7 na de uitzaaiing werden er elke dag immunocytochemische kleuringen uitgevoerd. Uit ons onderzoek bleek dat een behoorlijke subpopulatie van OLN-93 cellen, op alle dagen, A2B5 tot expressie bracht. Dit is een typische merker voor O-2A progenitors (5). De aanwezigheid ervan toont aan dat een groot gedeelte van de OLN-93 cellen nog in een immatuur stadium verkeert. Voor GalC, een typische merker voor immature OLGn, werd er gedurende 7 dagen, op geen enkele dag, immunoreactiviteit waargenomen. De expressie van GalC kondigt *in vivo* de terminale OLG differentiatie aan en daarmee ook het verlies van proliferatiemogelijkheden (7). Door de afwezigheid van GalC kan aangenomen worden dat OLN-93 cellen de proliferatiecapaciteit nog niet verloren hebben.

Na 5 div werd er een uitgesproken expressie van MAG waargenomen. MAG komt typerend voor bij mature OLGn en de aanwezigheid ervan in OLN-93 cellen wijst erop dat deze cellen zich na 5 div in een matuur stadium bevinden. Aangezien er in dit onderzoek gezocht werd naar een model voor mature OLGn, werd het stadium waarin de OLN-93 cellen zich na 5 div bevinden, als meest matuur en ideaal bevonden voor het vervolg van het onderzoek.

Om de karakterisatie van OLN-93 cellen, in hun meest mature stadium, verder te specificeren, werd eveneens de expressie van CNPase en MBP nagegaan. CNPase is een eiwit dat het immature stadium van de OLG aankondigt en gedurende de verdere maturatie aanwezig blijft. Tijdens ons onderzoek werd een sterke immunoreactiviteit voor CNPase ondervonden. Daarnaast werd er een zwakke immunoreactiviteit voor MBP waargenomen. Dit is een typisch eiwit van mature OLGn. De hoge expressie van CNPase en lage expressie van MBP kunnen erop wijzen dat OLN-93 cellen zich reeds in een matuur stadium bevinden, maar nog lang niet volledig gedifferentieerd zijn. Dit strookt met de bevindingen van Van Meeteren et al. (39). Zij hebben ondervonden dat differentiërende OLN-93 cellen *in vitro* nooit volledig matuur worden. Ze blijven als het ware schommelen tussen het immature en mature stadium.

Uiteindelijk werd er nog een opmerkelijk feit vastgesteld en dat was de aanwezigheid van GFAP. Zowel bij dag 1 als na 7 div werd een subpopulatie van OLN-93 cellen zeer zwak immunoreactief bevonden voor GFAP. Dit is een intermediair filament in volwassen astrocyten en zou bij OLGn niet mogen voorkomen. De aanwezigheid ervan kan mogelijk verklaard worden door het feit dat deze cellen afstammen van O-2A progenitors. Deze kunnen, *in vitro*, in aanwezigheid van FCS, prolifereren tot type 2 astrocyten, die gekenmerkt worden door de aanwezigheid van A2B5 en GFAP (7). Daarnaast ontstaan cellijnen uit getransformeerde cellen; het is dus mogelijk dat de productie van GFAP geactiveerd werd door de transformatie (40). Onze bevindingen over de aanwezigheid van A2B5 en GFAP en de afwezigheid van GalC zijn echter in strijd met de waarnemingen van Richter-Landsberg et al. (33). Zij beschrijven dat de OLN-93 cellen geen A2B5 en GFAP bezitten, maar wel GalC tot expressie brengen.

Voor de immunocytochemische kleuringen van GalC, CNPase en MAG werd TX gebruikt. Hierdoor werd zowel de intra- als extracellulaire aanwezigheid van het bewuste eiwit of lipide aangetoond. Door de kleuringen zonder TX uit te voeren werd bevestigd dat OLN-93 cellen transportmechanismen bezitten om deze eiwitten en lipiden naar de extracellulaire zijde van het celmembraan te vervoeren, zoals dit eveneens bij OLGn uit primaire culturen werd waargenomen.

Nu de OLN-93 cellen na 5 div in DMEM met 10% FCS als meest matuur werden bevonden, wilden we nagaan welke effecten een FCS-vermindering teweeg zou brengen.

Na 5 div werden de OLN-93 cellen 24u geïncubeerd in DMEM met 0,5% FCS en uit onze waarnemingen bleek dat de cellen een rondere vorm, donkerdere kernen en minder uitlopers hadden. Richter-Landsberg et al. (33) verklaren daarentegen geen morfologische verschillen te zien na incubatie in medium met 0,5% FCS.

Op het gebied van immunoreactiviteit werden er eveneens een aantal verschillen waargenomen. Na 24u incubatie in medium met 0,5% FCS werd er geen immunoreactiviteit meer waargenomen voor A2B5 en werd MAG sterker tot expressie gebracht. Dit kan erop wijzen dat de cellen verder gematureerd zijn onder invloed van de FCS-vermindering, want medium met 0,5% FCS wordt gebruikt om de differentiatie te bevorderen (39).

Na de immunocytochemische karakterisatie wilden we nagaan hoe OLN-93 cellen er op ultrastructureel niveau uitzien. De aanwezigheid van euchromatische celkernen met 1 of meerdere prominente nucleoli zijn typische kenmerken voor cellijnen en wijzen erop dat het hier metabool actieve cellen betreft. Het uitgebreide RER en goed ontwikkeld golgi apparaat tonen aan dat er in de OLN-93 cellen actieve biosynthese en transport van eiwitten en lipiden plaatsvindt (3). Daarnaast bezitten de uitlopers een groot aantal microtubuli en komen er cellen voor met zeer ronde kernen. Dit zijn typische kenmerken van mature OLGn uit een primaire cultuur (12).

Na de morfologische karakterisatie werden de effecten van TGF- β 1 bestudeerd op OLN-93 cellen van 5 div. De behandelingen werden zowel uitgevoerd in DMEM met 10% FCS als in DMEM met 0,5% FCS, enerzijds omdat een daling in het serum een differentiatie van OLN-93 cellen induceert en anderzijds om de effecten van TGF- β 1 beter te kunnen bestuderen. Fase contrast microscopie toonde aan dat OLN-93 cellen, zowel in medium met 10% als 0,5% FCS, na 24u en 48u behandeling met 10 en 50 ng/ml TGF- β 1, veel vlakker werden, maar geen tekenen van celdood vertoonden. Om dit te bewijzen werden er flow cytometrische analyses uitgevoerd met behulp van de FACS. Controle experimenten toonden aan dat er gemiddeld 10% apoptose voorkwam bij onbehandelde cellen. Dit is een normaal gegeven, want apoptose maakt standaard deel uit van de OLG-ontwikkeling (28). Er werd statistisch aangetoond dat zowel na 24u als na 48u behandeling met verschillende dosissen TGF- β 1, geen significante verschillen in het percentage apoptose werden waargenomen. Na uitvoering van een TUNEL assay kon

nogmaals bevestigd worden dat TGF- β 1 geen verhoogde hoeveelheid apoptose veroorzaakt in mature OLN-93 cellen.

HE kleuringen toonden aan dat er na behandeling met TGF- β 1 een kernhypertrofie optreedt. Daarnaast werden de cellen vlakker en kregen een uitgespreid cytoplasma. Hierdoor vergrootte het celoppervlak waardoor de intercellulaire contacten kunnen toenemen. Door de uitspreiding van het cytoplasma leken de uitlopers te verdwijnen of misvormd te worden.

Op immunocytochemisch niveau werd, na behandeling met TGF- β 1, een mogelijke vermindering in immunoreactiviteit waargenomen bij OLN-93 cellen in medium met 10% en 0,5% FCS. Om het effect op de eiwitexpressie in detail te bestuderen, dient er verder onderzoek verricht te worden met behulp van Western blot. Er kan wel geconcludeerd worden dat de effecten van TGF- β 1 niet beïnvloed worden door de aanwezigheid van FCS in het medium.

Bij behandelde cellen werd op ultrastructureel niveau voornamelijk de kernhypertrofie en uitbreiding van het cytoplasma waargenomen. Hierdoor was het moeilijk om afzonderlijke cellen af te bakenen en uitlopers waar te nemen. Na behandeling met TGF- β 1 leken de uitlopers te verdwijnen waardoor de cellen een fibroblastachtig uiterlijk kregen (4). De morfologische veranderingen en in het bijzonder de aantasting van de uitlopers, bevestigen de waarnemingen bij mature primaire OLGn na behandeling met TGF- β 1.

Er zijn verschillende hypothesen en theorieën over het ontstaan van MS. Cytokines, zoals TGF- β 1, spelen hierbij een belangrijke rol (41). De interactie tussen cytokines en neuroglia kunnen het verloop van de ziekte bepalen en remyelinisatie promoten of inhiberen. Spontane remyelinisatie komt frequent voor in MS lesies, maar zal uiteindelijk falen. Er wordt aangenomen dat “volwassen” progenitorcellen de bron zijn van remyeliniserende OLGn. Het differentiatieproces van deze progenitorcellen en daarbij ook de remyelinisatie, wordt beïnvloed door een groot aantal groeifactoren en cytokines (42). TGF- β 1 kan hierin mogelijk een rol spelen. Uit ons onderzoek bleek dat het een verhoogde hoeveelheid apoptose kan veroorzaken bij O-2A progenitors. Mogelijk zou het dit ook kunnen veroorzaken bij de populatie volwassen progenitorcellen, al werd dit nog niet eerder aangetoond. Indien TGF- β 1 apoptose veroorzaakt bij volwassen

progenitorcellen, kan de afname van die celpopulatie een verklaring vormen voor het falen van de remyelinisatie. De morfologische veranderingen die TGF- β 1 induceert in maturerende O-2A progenitors en mature OLGn kan eveneens bijdragen tot het uitblijven van remyelinisatie in MS plaques. Zowel bij differentiërende O-2A progenitors en mature OLGn uit een primaire cultuur, als bij de cellijn OLN-93 werden er na behandeling met TGF- β 1, vormveranderingen waargenomen en leken de uitlopers te verdwijnen en te misvormen. Indien deze bevindingen ook in vivo plaatsvinden, kunnen maturerende OLGn geen volwaardige myelineschedes meer rond de axonen vormen waardoor er geen remyelinisatie tot stand komt.

John et al (29) toonde reeds eerder aan dat TGF- β 1 mogelijk een nefaste invloed kan uitoefenen in MS lesies. TGF- β 1 induceert de Jagged-Notch-Hes pathway waardoor de maturatie van OLGn belemmerd wordt. Dit kan een mogelijke oorzaak zijn voor het falen van de remyelinisatie in MS.

Tot slot is TGF- β 1 een promotor van gliose. Hierdoor wordt er een astrocytenlitteken gevormd in gedemyeliniseerde gebieden. Door het opvullen van deze gebieden wordt de vorming van secundaire lesies voorkomen, maar zijn axonale regeneratie en remyelinisatie uitgesloten (27).

We kunnen besluiten dat TGF- β 1 mogelijk een belangrijke rol speelt bij het falen van de remyelinisatie in MS. De verhoogde apoptose bij O-2A progenitors, vormveranderingen bij maturerende O-2A progenitors en mature OLGn en zijn rol in astrogliose, dragen hiertoe bij. Deze studie heeft het MS vraagstuk niet opgelost, maar kan mogelijk wel bijdragen tot het beter begrijpen van de rol van TGF- β 1 hierin.

Referenties

1. Underwood JCE. General and systematic pathology. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2003.
2. Tortora GJ, Grabowski SR. Principles of anatomy and physiology. New York: John Wiley & Sons; 2000.
3. Stevens A, Lowe J. Histologie van de mens. Houten: Bohn Stafleu Van Loghum; 1997.
4. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology. Connecticut: Appleton & Lange; 1995.
5. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*. 2001;81:871-911.
6. Chao Y, Takeda M, Soliven B. Regulation of cell cycle proteins by TNF- α and TGF- β in cells of oligodendroglial lineage. *J Neuroimmunol* 2000;108:2-10.
7. Compston A, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle H. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. London: Churchill Livingstone; 1999.
8. Billon N, Jolicoeur C, Ying QL, Smith A, Raff M. Normal timing of oligodendrocyte development from genetically engineered, lineage-selectable mouse ES cells. *J Cell Sci* 2002;115:3657-65.
9. McKinnon RD, Dubois-Dalcq M. Cytokines and growth factors in the development and regeneration of oligodendrocytes. In: Ransohoff RM, Benveniste EN, editors. *Cytokines and the CNS*. Boca Raton: CRC Press; 1996. p. 85-105.
10. Grinspan JB, Edell E, Carpio DF, Beesley JS, Lavy LL, Pleasure D, Golden JA. Stage-specific effects of bone morphogenetic proteins on the oligodendrocyte lineage. *J Neurobiol*. 2000;43:1-17.
11. Miller RH. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol*. 2002;67:451-67.
12. McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*. 1980;85:890-902.
13. Popko B, Baerwald KD. Oligodendroglial response to the immune cytokine interferon gamma. *Neurochem Res*. 1999;24:331-8.
14. Goodin DS, Frohman EM, Garmany Jr. GP, Halper J, Likosky WH, Lublin FD, Silberberg DH, Stuart WH, van den Noort S. Disease modifying therapies in multiple sclerosis. *Neurology* 2002;58:169-78.
15. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple Sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab Invest*. 2001;81:263-81.
16. Bar-Or A, Oliveira EML, Anderson DE, Hafler DA. Molecular pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999;100:252-59.
17. Kornek B, Lassmann H. Neuropathology of multiple sclerosis – new concepts. *Brain Res Bull*. 2003;61:321-6.
18. Kerr JFR, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV. Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol*. 1995;46:1-27.
19. Uchiyama Y. Apoptosis: the history and trends of its studies. *Arch Histol cytol* 1995;58:127-37.
20. Wilson JW, Potten CS. Morphological recognition of apoptotic cells. In: Studzinski GP, editor. *Apoptosis, a practical approach*. New York: Oxford University Press; 1999. p. 19-39.
21. Raine CS. The Norton Lecture: a review of the oligodendrocyte in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol*. 1997;77:135-52.
22. Franklin H, Epstein MD. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med*. 2000;342:1350-8.
23. Wyss-Coray T. Transforming Growth Factor- β signaling pathway as a therapeutic target in neurodegeneration. *J Mol Neurosci*. 2004;24:199-203.
24. Luo J, Lang JA, Miller MW. Transforming growth factor β 1 regulates the expression of cyclooxygenase in cultured cortical astrocytes and neurons. *J Neurochem* 1998;71:526-34.
25. Diemel LT, Jackson SJ, Cuzner ML. Role for TGF- β 1, FGF-2 and PDGF-AA in a myelination of CNS aggregate cultures enriched with macrophages. *J Neurosci Res*. 2003;74:858-67.
26. Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol Ther*. 2005;106:163-77.

-
27. Yun SJ, Kim MO, Kim SO, Park J, Kwon YK, Kim IS, Lee EH. Induction of TGF- β -inducible gene-h3 (β ig-h3) by TGF- β 1 in astrocytes: implications for astrocyte response to brain injury. *Mol Brain Res* 2002;107:57-64.
 28. Schuster N, Bender H, Philippi A, Subramaniam S, Strelau J, Wang Z, Krieglstein K. TGF- β induces cell death in the oligodendroglial cell line OLI-neu. *Glia* 2002;40:95-108.
 29. John GR, Shankar SL, Shafit-Zagardo B, Massimi A, Lee SC, Raine CS, Brosnan CF. Multiple sclerosis: Re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation. *Nature Medicine* 2002;8:1115-21.
 30. McCartney-Francis NL, Frazier-Jessen M, Wahl SM. TGF- β : a balancing act. *Intern Rev Immunol*. 1998;16:553-80.
 31. Koo GC, Manyak CL, Dasch J, Ellingsworth L, Shultz LD. Suppressive effects of monocytic cells and transforming growth factor-beta on natural killer cell differentiation in autoimmune viable motheaten mutant mice. *J Immunol*. 1991;147:1194-200.
 32. Roitt I, Rabson A. Really essential medical immunology. Oxford: Blackwell Science; 2000.
 33. Richter-Landsberg C, Heinrich M. OLN-93: a new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures. *J Neurosci Res*. 1996;45:161-73.
 34. van der Pal RH, Vos JP, van Golde LM, Lopes-Cardozo M. A rapid procedure for the preparation of oligodendrocyte-enriched cultures from rat spinal cord. *Biochim Biophys Acta* 1990;1051:159-65.
 35. Rhodius CA, Thijs A. Van microscopie naar flowcytometrie. *Ned Tijdschr Geneesk* 2003;6:33-5.
 36. Uggeri J, Gatti R, Belletti S, Scandroglio R, Corradinin R, Rotoli BM, Orlandini G. Calcein-AM is a detector of intracellular oxidative activity. *Histochem Cell Biol*. 2004;122:499-505.
 37. Baron S, Gielen E, Smets I, vandeVen M, Steels P, Ameloot M. Reduced esterase activity as detected by calcein-AM is an early apoptotic marker in oligodendroglial cell lines.
 38. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Li X. Analysis of cell death by flow and laser-scanning cytometry. In: Studzinski GP, editor. *Apoptosis, a practical approach*. New York: Oxford University Press; 1999. p. 57-79.
 39. van Meeteren M, Koetsier MA, Dijkstra CD, van Tol EAF. Markers for OLN-93 oligodendroglia differentiation. *Dev Brain Res*. 2005;156:78-86.
 40. Herpers MJ, Budka H. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in oligodendroglial tumors: gliofibrillary oligodendroglioma and transitional oligoastocytoma as subtypes of oligodendroglioma. *Acta Neuropathol*. 1984;64:265-72.
 41. Losy J, Michalowska-Wender G. In vivo effect of interferon- β 1a on interleukin-12 and TGF- β 1 cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2002;106:44-46.
 42. Stangel M. Remyelinating and neuroprotective treatments in multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2004;13:331-47.

Appendix

*** Samenstelling Hank's Balanced Salt Solution (HBSS):**

Product	per liter MilliQ
NaCl	8,10 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
KCl	0,40 g
TES	2,30 g
Na ₂ HPO ₄	0,053 g

Producten geleverd door Sigma-Aldrich, Bornem, België.

*** Samenstelling Normalized Medium (NM):**

NM Stock		NM	
Product	per liter MilliQ	Product	per 100 ml
DMEM	10 g	NM Stock	95 ml
TES	2,42 g	P/S	0,1 ml
NaHCO ₃	1,24 g	FCS	5 ml

Producten geleverd door Sigma-Aldrich, Bornem, België.

*** Samenstelling Chemically Defined Medium (CDM):**

CDM Stock		CDM	
Product	per liter MilliQ	Product	per 100 ml
DMEM	7,53 g	CDM Stock	96,3 ml
Ham's F12	2,67 g	CDM Mix	3,5 ml
Nutriënt mix		P/S	0,1 ml
		ASC	0,1 ml

*** Bereiding Binding Buffer (BB):**

- 100 µl x aantal stalen
- 1/4 BB stock + 3/4 gedestilleerd water

*** Bereiding Calceïne-AM oplossing (1 µmol/l):**

1 ml PBS + 0.5 µl pluronic acid + 1 µl Calceïne-AM stockoplossing (1 mM)